

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2003 年 10 月 23 日 (23.10.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/087349 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 5/02, 5/06, 15/09, C12Q 1/02, A61K 35/39, A61P 3/10
- (21) 国際出願番号: PCT/JP03/04812
- (22) 国際出願日: 2003 年 4 月 16 日 (16.04.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2002-115201 2002 年 4 月 17 日 (17.04.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 大塚製薬株式会社 (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒101-8535 東京都千代田区神田町 2 丁目 9 番地 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 梅澤 明
- 弘 (UMEZAWA, Akihiro) [JP/JP]; 〒270-0014 千葉県松戸市小金 3 1 6 Chiba (JP). 伊澤 良兼 (IZAWA, Yoshikane) [JP/JP]; 〒202-0002 東京都西東京市ひばりが丘北 2-1-3 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 三枝 英二, 外 (SAEGUSA, Eiji et al.); 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町 1-7-1 北浜 T N K ビル Osaka (JP).
- (81) 指定国 (国内): AU, CA, JP, US.
- (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF FORMING PANCREATIC  $\beta$  CELLS FROM MESENCHYMAL CELLS(54) 発明の名称: 間葉系細胞から膵  $\beta$  細胞を形成する方法

(57) Abstract: It is intended to provide a method of forming pancreatic  $\beta$  cells from mesenchymal cells characterized by comprising using mammal-origin mesenchymal cells as starting cells, culturing these cells in the presence of, for example, a pancreatic  $\beta$  cell-forming agent, and selecting and separating the thus obtained pancreatic  $\beta$  cells with the use of a gene expressed specifically in such cells as a selection marker; a remedy for glucose intolerance which comprises pancreatic  $\beta$  cells obtained by the above method as the active ingredient; a pancreatic  $\beta$  cell-forming agent such as a cytokine to be used in the above method; a method of screening a candidate compound promoting the formation of pancreatic  $\beta$  cells from mesenchymal cells; and a pancreatic  $\beta$  cell formation promoter obtained by this screening method.

(57) 要約: 哺乳動物由来の間葉系細胞を起源細胞として、例えば膵  $\beta$  細胞形成剤の存在下に該細胞を培養し、得られる膵  $\beta$  細胞を該細胞で特異的に発現する遺伝子を選択マーカーとして選択、分離することを特徴とする間葉系細胞から膵  $\beta$  細胞を形成する方法、該方法によって得られる膵  $\beta$  細胞を有効成分とする耐糖異常疾患の治療剤、該方法に利用するサイトカインなどの膵  $\beta$  細胞形成剤、間葉系細胞からの膵  $\beta$  細胞の形成を促進する候補化合物のスクリーニング方法、該スクリーニング方法によって得られる膵  $\beta$  細胞形成促進物質を提供する。

WO 03/087349 A1

## 明 細 書

## 間葉系細胞から膵β細胞を形成する方法

## 技 術 分 野

5 本発明は、間葉系細胞から膵β細胞を形成させる方法に関する。また本発明は、間葉系細胞から膵β細胞を形成させる膵β細胞形成剤に関する。さらに本発明は、間葉系細胞からの膵β細胞形成を促進させる候補物質のスクリーニング方法に関する。加えて本発明は、間葉系細胞から膵β細胞を形成させる方法によって得られる膵β細胞を利用する耐糖能異常疾患の治療方法および治療剤に関する。

10

## 背 景 技 術

膵β細胞は、胎児期ではインスリンを産生しながら活発に細胞分裂を行っているが、炎症、出生後の加齢(老化)などに伴い次第に変性壊死する。従って、これらの患者などの生体内に残存する膵β細胞数は少なく、これが血糖インスリン値の低下や耐糖能異常を招く。

15 かかる炎症などによる膵β細胞の変性壊死に伴われる耐糖能異常疾患は、これまでインスリン投与の増強などの対症療法を中心に治療が行われてきた。これに対して、膵β細胞移植は、重症耐糖能異常疾患に対する根本的な治療法と考えられるが、臓器提供者の不足、脳死判定の難しさ、拒絶反応、医療費の高騰などの問題から、一般的な医療に普及するには至っていない。実際、糖尿病などの耐糖能異常に基づく疾患は、腎障害、神経障害、網膜障害、虚血性心疾患、高血圧などの重大なリスクファクターであり、失われた膵β細胞を再生することができれば、医療福祉の大きな前進につながると考えられる。

25 現在までに、膵β細胞の性質を保存した細胞株としては、insulinoma細胞およびRIN細胞が知られている〔Clark, S.A., et al., Diabetes, 46 (10), 1663 (1997)〕。しかしながら、これらの細胞の移植によると腫瘍が形成されるため、これらの細胞は細胞移植に適さない問題がある。このような背景のもと、膵β細胞を再構築するために以下の3つの方法が考えられた。

1つ目の方法は、膵β細胞以外の細胞を膵β細胞に変換する方法である。この方法は、

例えば肝細胞に Pdx-1/IPF-1 を導入すると  $\beta$  細胞様細胞に変換されることから類推された[Nature Med, 6 (5): 568, 2001]。

2 つ目の方法は、膵  $\beta$  細胞に再び分裂能を付与する方法である。これは、胎児期に  $\beta$  細胞が分裂する現象および切除膵において  $\beta$  細胞が分裂する現象に基づいている。

- 5     3 つ目の方法は、未分化な幹細胞から膵  $\beta$  細胞を誘導する方法である。すでに、胚性幹細胞 (ES 細胞) から膵  $\beta$  細胞を誘導できることが知られている[Science, 292: 1389-1393, 2001; Diabetes, 49: 157-162, 2000; Diabetes, 50: 1691-1697, 2001]。しかるに、この ES 細胞は、これを生体に移植するとカルシノーマを形成する欠点があり、また抗原性などの問題が存在する。また、成人の膵ラ氏島に存在する幹細胞から膵  $\beta$  細胞を誘導する方法も知られている[Diabetes, 50: 521-533, 2001]。

上記のような ES 細胞を現実の医療に応用するためには、少なくとも膵  $\beta$  細胞前駆細胞あるいは膵  $\beta$  細胞を純粋に精製する技術が不可欠である。抗原性の問題はクローン化の技術により解決できる可能性が示唆されるが、煩雑な操作を必要とすることから、一般的な医療への応用は容易ではない。

- 15     未分化な細胞である膵  $\beta$  細胞前駆細胞を取得して移植に用いる方法も考えられ、動物を用いた実験では膵  $\beta$  細胞として有効に機能することが報告されている (Ramiya, V. K., et al., Nat. Med., 6(3), 278(2000); Soria, B., et al., Diabetes, 49(2), 157(2000))。該報告は患者自身から骨髓液を取得して、in vitro で細胞培養および薬剤処理を行った後、膵  $\beta$  細胞の障害部位に移植する細胞治療が現実的な医療として可能になることを示唆している。

成体骨髓には、造血系幹細胞および血管幹細胞以外に、間葉系幹細胞が存在し、該間葉系幹細胞からは骨細胞、軟骨細胞、腱細胞、靱帯細胞、骨格筋細胞、脂肪細胞、間質細胞、肝臓 oval 細胞が分化誘導できることが報告されている[Science, 284, 143-147 (1999); Science, 284, 1168-1170 (1999)]。

- 25     生体内の組織から目的の細胞を取得する方法としては、目的細胞に特有の各種表面抗原を認識する抗体を用いる方法が知られている。上記細胞特有の表面抗原については、現在、以下の知見が得られている。即ち、例えば未熟な造血幹細胞は、CD34+/CD38-/HLA-DR-/CD90 (Thy-1)+ の特性を有しており、該造血幹細胞が分化するに従い、CD38 が発現し、CD90 (Thy-1) が消失する[蛋白質核酸酵素 Vol. 45, No. 13, 2056-2062 (2000)]。

血管内皮細胞は、CD34、CD31、Flk-1、Tie-2、E-セレクトリンなどのマーカーを発現しており[分子心血管病, Vol. 1, No. 3, 294-302 (2000)]、骨髄の間葉系幹細胞は、CD90、CD105、CD140 などのマーカーを発現している[Science, 284, 143-147 (1999); Science, 284, 1168-1170 (1999)]。しかしながら、 $\beta$ 細胞を誘導できる間葉系幹細胞に関して、上記のような特有の表面マーカーは現在尚明らかにされていない。

### 発 明 の 開 示

以上のように、糖尿病などの耐糖能異常疾患の治療をより安全かつ確実にに行い得る技術、特に、安全に移植可能な $\beta$ 細胞の確立乃至 $\beta$ 細胞の再生技術、これらに付随する $\beta$ 細胞の増殖、分化の制御技術、該制御のためのサイトカイン乃至転写因子の解明、同定などが、当業界で望まれている。

本発明者は、上記のように当業界で望まれている耐糖能異常疾患の治療に有効な新しい技術を提供することを目的として鋭意研究を重ねる過程において、以下の知見を得た。

すなわち、マウス骨髄由来の間葉系細胞を1細胞レベルにまず分離して、 $\beta$ 細胞形成能を有する細胞株を複数取得した。次に、得られた細胞株を、GFP (Green Fluorescent Protein)を発現するレトロウイルスベクターを用いて標識し、1つの細胞を蛍光顕微鏡下で追跡することによって、該間葉系細胞が、 $\beta$ 細胞および神経細胞の少なくとも2種の異なる細胞に分化誘導できる多分化能(Pluripotent)を有する幹細胞であることを見出した。さらに、該幹細胞が、確率的(stochastic)に $\beta$ 細胞および神経細胞の系列に分化することを見出すと共に、この分化に関与する分化誘導剤( $\beta$ 細胞形成剤)としての転写因子、液性因子およびマトリックスを明らかにした。次に、移植実験により、上記間葉系細胞が骨、軟骨、脂肪、心筋、骨格筋、神経および血管になることを確認した。これらの結果から、本発明者は、上記間葉系細胞が、今まで知られていた骨髄に存在する造血系組織にのみ分化する造血幹細胞および骨格筋、脂肪細胞、骨などの沿軸中胚葉系組織にのみ分化する間葉系幹細胞とは異なって、外胚葉系、中胚葉系および内胚葉系の3胚葉のすべてに分化できる全能性を有していることを見出した。

また、本発明者は、上記間葉系細胞について、造血系細胞の表面抗原である CD34、CD117、CD14、CD45、CD90、Sca-1、Ly6c および Ly6g を認識する抗体、血管内皮細胞の表面抗原である Flk-1、CD31、CD105 および CD144 を認識する抗体、間葉系細胞の表面

抗原である CD140 を認識する抗体、インテグリンの表面抗原である CD49b、CD49d、CD29 および CD41 を認識する抗体、マトリックス受容体である CD54、CD102、CD106 および CD44 を認識する抗体などを用いて、表面抗原の発現を解析した結果、該間葉系細胞は今までに知られていない新しい発現形態を示す膝β細胞に分化し得る細胞であることを見出した。本発明は、これらの知見を基礎として完成されたものである。

即ち、本発明は、以下の項1-項29を提供する。

項1. 哺乳動物由来の間葉系細胞を以下の(a)～(e)から選ばれる少なくとも  
10 1つの工程に付すことを特徴とする、間葉系細胞から膵β細胞を形成する方法：

- a) 哺乳動物の検体から得られる膵β細胞に分化し得る間葉系細胞を増殖させる工程、
- b) 哺乳動物の検体から得られる間葉系細胞または工程 a) で得られる間葉系細胞から、細胞膜抗原に結合性を有する抗体を用いて膵β細胞に分化し得る間葉系細胞を選択して分離する工程、
- 15 c) 工程 a) または b) で得られる膵β細胞に分化し得る間葉系細胞またはこれを含む細胞を、該細胞が接触可能なように接着分子/細胞外基質をコートした反応容器中で培養する工程、
- d) 工程 a)、b) または c) で得られる膵β細胞に分化し得る間葉系細胞またはこれを含む細胞を膵β細胞形成剤と接触させて培養する工程、および
- 20 e) 工程 c) または d) で得られる膵β細胞を、膵β細胞で特異的に発現する遺伝子を選択マーカーとして選択して分離する工程。

項 2. 間葉系細胞が、骨髓、筋肉、脾臓、肝臓、小腸、大腸、腎臓、皮下組織、子宮内膜、血液、臍帯血又は胎盤から得られる、項 1 に記載の間葉系細胞から脾β細胞を形成する方法。

項 3. 工程 b)における間葉系細胞の選択が、CD140 陽性抗体を用いて行われる項 1 または 2 に記載の間葉系細胞から膵β細胞を形成する方法。

項 4. 工程 e)における膵β細胞に特異的に発現する遺伝子が、インスリンである項 1 から 3 のいずれかに記載の間葉系細胞から膵β細胞を形成する方法。

5 項 5. 工程 d)における膵β細胞形成剤が、サイトカイン、生理活性物質、転写因子 および接着分子/細胞外基質からなる群から選ばれる少なくとも 1 種である項 1 から 4 のいずれかに記載の間葉系細胞から膵β細胞を形成する方法。

10 項 6. サイトカインが、肝細胞成長因子(HGF)、線維芽細胞増殖因子(bFGF)/FGF-2、インスリン、トランスフェリン、ヘパリン結合 EGF、ガストリン、TGF-β、インスリン様成長因子(IGF-1)、パラサイロイド・ホルモン関連蛋白(PTHrP)、成長ホルモン(growth hormone)、プロラクチン、プラセンタル・ラクトジェン(Placental lactogen)、グルカゴン様ペプチド 1(Glucagon like peptide-1)、Exendin-4 および KGF(karatinocyte growth factor)からなる群から選ばれる少なくともひとつである、項 5 に記載の間葉系細胞を膵β細胞に形成させる方法。

15

項 7. 生理活性物質が、ニコチンアミド、ベータセルリン、アクチビン A、プロゲステロン、プトレシン(Putrecine)およびセレンウム(Selenium)からなる群から選ばれる少なくともひとつである、項 5 に記載の間葉系細胞を膵β細胞に形成させる方法。

20 項 8. 転写因子が、PTF1a/PTF-P48、Isl-1、Pdx-1/IPF-1、Beta2/neuroD、ngn3、PAX-6、PAX-4、Hlx-9、Nkx2.2、Nkx6.1、HNF1α、HNF1βおよび HNF4αからなる群から選ばれる少なくともひとつである、項 5 に記載の間葉系細胞を膵β細胞に形成させる方法。

25 項 9. 接着分子/細胞外基質が、ゼラチン、ラミニン、コラーゲン、アガロース、フィブロネクチンおよびオルニチンからなる群から選ばれる少なくともひとつである、項 5 に記載の間葉系細胞を膵β細胞に形成させる方法。

項 10. サイトカイン、生理活性物質、転写因子および接着分子/細胞外基質からなる

群から選ばれる少なくとも1種を有効成分として含有する、項1から9のいずれかに記載の方法に用いられる膵β細胞形成剤。

5 項 11. サイトカインが、肝細胞成長因子(HGF)、線維芽細胞増殖因子(bFGF)/FGF-2、インスリン、トランスフェリン、ヘパリン結合 EGF、ガストリン、TGF-β、インスリン様成長因子(IGF-1)、パラサイロイド・ホルモン関連蛋白(PTHrP)、成長ホルモン(growth hormone)、プロラクチン、プラセンタル・ラクトジェン(Placental lactogen)、グルカゴン様ペプチド1(Glucagon like peptide-1)、Exendin-4 および KGF からなる群から選ばれる少なくともひとつである、項10に記載の膵β細胞形成剤。

10

項 12. 生理活性物質が、ニコチンアミド、ベータセルリン、アクチビン A、プロゲストロン、プトレシン(Putrecine)およびセレンウム(Selenium)からなる群から選ばれる少なくともひとつである、項10に記載の膵β細胞形成剤。

15 項 13. 転写因子が、PTF1a/PTF-P48、Isl-1、Pdx-1/IPF-1、Beta2/neuroD、ngn3、PAX-6、PAX-4、Hlx-9、Nkx2.2、Nkx6.1、HNF1α、HNF1βおよび HNF4αからなる群から選ばれる少なくともひとつである、項10に記載の膵β細胞形成剤。

20 項 14. 接着分子/細胞外基質が、ゼラチン、ラミニン、コラーゲン、アガロース、フィブロネクチンおよびオルニチンからなる群から選ばれる少なくともひとつである、項10に記載の膵β細胞形成剤。

25 項 15. 候補物質の存在下に項1に記載の方法に従って間葉系細胞から膵β細胞を形成させ、候補物質の非存在下に形成される膵β細胞と対比して、膵β細胞の形成を促進させる作用を奏する候補物質を選択することを特徴とする、間葉系細胞からのβ細胞の形成を促進する候補物質をスクリーニングする方法。

項 16. 間葉系細胞が、骨髄、筋肉、脾臓、肝臓、小腸、大腸、腎臓、皮下組織、子宮内膜、血液、臍帯血又は胎盤から得られる、項15に記載の間葉系細胞からの膵β

細胞の形成を促進する候補物質をスクリーニングする方法。

5 項 17. 工程 b)における間葉系細胞の選択が、CD140 陽性抗体を用いて行われる項 15  
または 16 に記載の間葉系細胞からの $\beta$ 細胞の形成を促進する候補物質をスクリーニ  
ングする方法。

10 項 18. 工程 e)における $\beta$ 細胞に特異的に発現する遺伝子が、インスリンである項  
15 から 17 のいずれかに記載の間葉系細胞からの $\beta$ 細胞の形成を促進する候補物質を  
スクリーニングする方法。

項 19. 工程 d)における $\beta$ 細胞形成剤が、サイトカイン、生理活性物質、転写因子  
および接着分子/細胞外基質からなる群から選ばれる少なくとも 1 種である項 15 から  
18 のいずれかに記載の間葉系細胞からの $\beta$ 細胞の形成を促進する候補物質をスクリ  
ーニングする方法。

15

20 項 20. サイトカインが、肝細胞成長因子(HGF)、線維芽細胞増殖因子(bFGF)/FGF-2、  
インスリン、トランスフェリン、ヘパリン結合 BGF、ガストリン、TGF- $\beta$ 、インスリ  
ン様成長因子(IGF-1)、パラサイロイド・ホルモン関連蛋白(PTHrP)、成長ホルモン  
(growth hormone)、プロラクチン、プラセンタル・ラクトジェン(Placental lactogen)、  
グルカゴン様ペプチド1(Glucagon like peptide-1)、Exendin-4 およびKGF からなる群  
から選ばれる少なくともひとつである、項 19 に記載の間葉系細胞からの $\beta$ 細胞の形  
成を促進する候補物質をスクリーニングする方法。

25 項 21. 生理活性物質が、ニコチンアミド、ベータセルリン、アクチビン A、プロゲ  
ストロン、プトレシン(Putrecine)およびセレンウム(Selenium)からなる群から選ば  
れる少なくともひとつである、項 19 に記載の間葉系細胞からの $\beta$ 細胞の形成を促進す  
る候補物質をスクリーニングする方法。

項 22. 転写因子が、PTF1a/PTF-P48、Isl-1、Pdx-1/IPF-1、Beta2/neuroD、ngn3、



PAX-6、PAX-4、Hlx-9、Nkx2.2、Nkx6.1、HNF1  $\alpha$ 、HNF1  $\beta$  および HNF4  $\alpha$  からなる群から選ばれる少なくともひとつである、項 19 に記載の間葉系細胞からの膵  $\beta$  細胞の形成を促進する候補物質をスクリーニングする方法。

- 5 項 23. 接着分子/細胞外基質が、ゼラチン、ラミニン、コラーゲン、アガロース、フィブロネクチンおよびオルニチンからなる群から選ばれる少なくともひとつである、項 19 に記載の間葉系細胞からの膵  $\beta$  細胞の形成を促進する候補物質をスクリーニングする方法。
- 10 項 24. 候補物質が培養組成物である項 15 から 23 のいずれかに記載の間葉系細胞からの膵  $\beta$  細胞の形成を促進する候補物質のスクリーニング方法。

- 項 25. 項 15 から 24 のいずれかに記載の間葉系細胞からの膵  $\beta$  細胞の形成を促進する候補物質のスクリーニング方法によって得られる、間葉系細胞からの膵  $\beta$  細胞の形成を促進する活性を有する物質。
- 15

項 26. 項 1 から 9 のいずれかに記載の方法によって得られる膵  $\beta$  細胞の有効量を患者に投与する、耐糖能異常に基づく疾患を有する患者の疾患を治療する方法。

- 20 項 27. 項 1 から 9 のいずれかに記載の方法によって得られる膵  $\beta$  細胞を有効成分として含有する、耐糖能異常に基づく疾患の治療剤。

項 28. 培養皿に単層培養された間葉系細胞上に、インスリン分泌細胞に分化されうる細胞を播き、共培養してインスリン分泌細胞に分化する方法。

25

項 29. インスリン分泌細胞に分化されうる細胞が、胚性幹細胞、膵幹細胞、小腸上皮幹細胞、肝臓由来幹細胞及び羊膜細胞からなる群から選ばれる 1 種である、項 28 に記載の共培養してインスリン分泌細胞に分化する方法。

本発明の間葉系細胞から膵 $\beta$ 細胞を形成する方法は、前述した通り、哺乳動物由来の間葉系細胞（膵 $\beta$ 細胞に分化し得る間葉系細胞を含む）を起源として、基本的には、該細胞を膵 $\beta$ 細胞に分化させた後（工程 c または d）、得られる膵 $\beta$ 細胞を分離（採取）する（工程 e）ことにより実施できる。

上記において起源とする間葉系細胞は、これを一般的方法に従い増殖させることができ（工程 a）、また該細胞より膵 $\beta$ 細胞に分化する能力を有する所望の間葉系細胞を選択、分離することができる（工程 b）。

かくして得られる膵 $\beta$ 細胞への分化能を有する細胞は、接着分子/細胞外基質（膵 $\beta$ 形成剤）をコートした反応容器中で培養する（工程 c）かまたは膵 $\beta$ 細胞形成剤と接触させて培養（膵 $\beta$ 細胞形成剤を含む培地で培養）する（工程 d）ことによって目的とする膵 $\beta$ 細胞に分化誘導される。

本発明方法の好ましい一実施態様によれば、哺乳動物の検体から得られる膵 $\beta$ 細胞に分化し得る間葉系細胞を増殖させ（工程 a）、工程 a で得られる間葉系細胞から、細胞膜抗原に結合性を有する抗体を用いて膵 $\beta$ 細胞に分化し得る間葉系細胞を選択して分離し（工程 b）、工程 b で得られる膵 $\beta$ 細胞に分化し得る間葉系細胞またはこれを含む細胞を、該細胞が接触可能なように接着分子/細胞外基質をコートした反応容器中で培養し（工程 c）、工程 c で得られる膵 $\beta$ 細胞に分化し得る間葉系細胞またはこれを含む細胞を膵 $\beta$ 細胞形成剤と接触させて培養し（工程 d）、工程 d で得られる膵 $\beta$ 細胞を、該膵 $\beta$ 細胞で特異的に発現する遺伝子を選択マーカーとして選択して分離する（工程 e）。

本発明方法の他の好ましい一実施態様によれば、哺乳動物の検体から得られる膵 $\beta$ 細胞に分化し得る間葉系細胞を増殖させ（工程 a）、次いで得られる膵 $\beta$ 細胞に分化し得る間葉系細胞またはこれを含む細胞を、該細胞が接触可能なように接着分子/細胞外基質をコートした反応容器中で培養する（工程 c）。

また、本発明方法の他の好ましい一実施態様は、哺乳動物の検体から得られる膵 $\beta$ 細胞に分化し得る間葉系細胞を増殖させ（工程 a）、次いで得られる膵 $\beta$ 細胞に分化し得る間葉系細胞またはこれを含む細胞を膵 $\beta$ 細胞形成剤と接触させて培養する（工程 d）。

上記膵 $\beta$ 細胞の形成（分化誘導）は、特に好ましくは、工程 c およびこれに引き続く工

程 d の採用によって行われる。

本発明方法において、哺乳動物由来の間葉系細胞(臍β細胞への分化能を有する間葉系細胞を含む)は、例えば骨髓、筋肉、脾臓、肝臓、小腸、大腸、腎臓、皮下組織、子宮内膜、血液、臍帯血などの生体組織または胎盤から単離することができ、好ましくは骨髓または臍帯血から単離される。

上記間葉系細胞は、多分化能幹細胞であり、臍β細胞に分化する能力の他にも各種細胞(生体組織の全細胞)に分化する能力を潜在的に有している。

本発明方法に好ましく利用できる臍β細胞への分化能を有する間葉系細胞は、細胞表面マーカーの発現型解析の結果、CD140 陽性であることが確認された。該 CD140 陽性細胞には、更に CD34 陽性および CD117 陽性である細胞、および CD34 陰性および CD117 陽性である細胞が含まれる。これらの内でも特に好ましい細胞としては、

- (1) CD34 陽性、CD117 陽性、CD14 陰性、CD45 陰性、CD90 陰性、Flk-1 陰性、CD31 陰性、CD105 陰性、CD144 陽性、CD140 陽性、CD49b 陰性、CD49d 陰性、CD29 陽性、CD54 陰性、CD102 陰性、CD106 陰性および CD44 陽性である細胞；
- (2) CD34 陽性、CD117 陽性、CD14 陰性、CD45 陰性、CD90 陰性、Flk-1 陰性、CD31 陰性、CD105 陰性、CD144 陰性、CD140 陽性、CD49b 陰性、CD49d 陰性、CD29 陽性、CD54 陰性、CD102 陰性、CD106 陰性および CD44 陽性である細胞；
- (3) CD34 陰性、CD117 陽性、CD14 陰性、CD45 陰性、CD90 陰性、Flk-1 陰性、CD31 陰性、CD105 陰性、CD144 陽性、CD140 陽性、CD49b 陰性、CD49d 陰性、CD29 陽性、CD54 陰性、CD102 陰性、CD106 陰性および CD44 陽性である細胞；並びに
- (4) CD34 陰性、CD117 陽性、CD14 陰性、CD45 陰性、CD90 陰性、Flk-1 陰性、CD31 陰性、CD105 陰性、CD144 陰性、CD140 陽性、CD49b 陰性、CD49d 陰性、CD29 陽性、CD54 陰性、CD102 陰性、CD106 陰性および CD44 陽性である細胞を挙げることができる。

上記間葉系細胞の起源とする生体組織などとしては、好ましくはマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ヤギ、サル、ヒトなどの哺乳動物に由来するものが挙げられる。ヒトの治療用途には特にヒト由来のものが好ましい。

以下、起源動物由来間葉系細胞から臍β細胞を形成する方法(臍β細胞の単離方法)

を、各工程乃至操作毎に順次詳述する。

#### 1. 膵β細胞への分化能を有する間葉系細胞の起源動物からの分離

- 膵β細胞への分化能を有する細胞は、前記した各種の生体組織または臍帯血から単離  
5 することができる。以下、生体組織としてヒト骨髓から膵β細胞への分化能を有する骨  
髄由来間葉系細胞を例にとり、その単離方法を具体的に述べる。

##### (1) 骨髓由来間葉系細胞の単離

- 胸骨または腸骨に骨髓穿刺を行う。骨髓穿刺針の内筒を抜き、ヘパリンを入れた注射  
器を装着して必要量の骨髓液を速やかに吸引する。平均的には10ml-20mlの骨髓液を吸  
10 引する。取得した骨髓液を1,000×gで遠心分離して骨髓由来間葉系細胞を回収後、該  
骨髓由来間葉系細胞をPBS (Phosphate Buffered Saline) で洗浄する。本ステップを2  
回繰り返した後、細胞培養用培地に再浮遊させて骨髓由来間葉系細胞液を得る。

- 該骨髓由来間葉系細胞液から膵β細胞への分化能を有する骨髓間葉系細胞(骨髓間質  
細胞)を単離する方法としては、上記で調製した細胞液中に混在する他の細胞、例えば  
15 血球系細胞、造血幹細胞、血管幹細胞などを除去する一般的な方法に従うことができる。  
その例としては、例えば、M. F. Pittenger et al. Science, 284, 143 (1999) に記  
載された方法を採用できる。該方法は、具体的には、まず骨髓由来間葉系細胞液を密度  
1.073g/ml の percoll に重層した後、1,100×g で30分間遠心分離して界面の細胞を回  
収することにより単離する。該骨髓由来間葉系細胞液に10×PBSを加えて9/10に希釈  
20 した percoll を同容量加えて混合した後、20,000×g で30分間遠心分離し、密度  
1.075-1.060g/ml の画分を回収して、膵β細胞への分化能を有する骨髓由来間葉系細胞  
を含む骨髓由来間葉系細胞混合物を取得する。

- 上記方法に従い取得した膵β細胞への分化能を有する骨髓由来間葉系細胞を含む骨髓  
由来間葉系細胞混合物を、96穴の培養プレートの各穴に1細胞のみが注入されるよう  
25 に希釈し、1細胞由来のクローンを多数調製した後、以下に記載する膵β細胞への分化  
能を有する骨髓由来間葉系細胞から所望の膵β細胞を誘導する方法を利用してクローン  
を処理し、インスリンを産生する細胞が出現するクローンを選択することにより、目的  
とする膵β細胞への分化能を有する骨髓由来間葉系細胞を得る。

ラットやマウスなどから膵β細胞への分化能を有する骨髓由来間葉系細胞を取得する

- 方法は、特に限定されないが、例えば以下の手順に従うことができる。即ち、ラットまたはマウスを頸椎脱臼により致死させ、消毒した後、大腿骨の皮膚ならびに大腿四頭筋を切除する。膝関節部分にハサミを入れて関節をはずし、大腿骨背面の筋肉を除去する。股関節部分にハサミを入れて関節を外し、大腿骨を取り出す。大腿骨に付着している筋肉をハサミでできるだけ除去した後、大腿骨の両端をハサミで切断する。骨の太さに応じた適当なサイズの針を 2.5ml の注射器に装着し、10%の FBS (牛胎仔血清) を含む  $\alpha$ -MEM ( $\alpha$ -modified MEM)、DMEM (Dulbecco's modified MEM)、IMDM (Isocove's modified Dulbecco's medium) などの細胞培養用培地の約 1.5ml を注射器に充填した後、注射針の先端を大腿骨の膝関節側の断端に差し込む。注射器内の培養液を骨髓内に注入して、股
- 10 関節側の断端から骨髓由来間葉系細胞を押し出す。得られる骨髓由来間葉系細胞をピペッティングにより培養液中に浮遊させる。かくして得られる骨髓液から、前述したヒト骨髓液からの骨髓由来間葉系細胞の単離方法と同様にして、膵  $\beta$  細胞への分化能を有するラットまたはマウス由来の骨髓由来間葉系細胞を単離することができる。

- 15 (2) 骨髓以外の組織からの膵  $\beta$  細胞への分化能を有する間葉系細胞の単離
- 骨髓以外の組織から、後述する 12. に記載の抗体を用いた分離方法により、膵  $\beta$  細胞への分化能を有する細胞を取得することができる。

骨髓以外の組織としては、好ましくは臍帯血があげられる。この臍帯血からの膵  $\beta$  細胞への分化能を有する細胞の単離は、具体的には以下の方法に従うことができる。

- 20 即ち、まず臍帯から臍帯血を分取し、直ちに 500units/ml の終濃度になるようにヘパリンを加える。よく混合した後、遠心分離して臍帯血から細胞を分取し、10%の FBS を含む  $\alpha$ -MEM、DMEM、IMDM などの細胞培養用培地に再浮遊させる。得られた細胞液から後述する抗体を利用して、膵  $\beta$  細胞への分化能を有する細胞を分離することができる。

25 2. 膵  $\beta$  細胞への分化能を有する間葉系細胞の培養

膵  $\beta$  細胞への分化能を有する間葉系細胞の培養は、適当な培地中で行われる。該培地としては、通常公知(例えば、組織培養の技術基礎編 第三版、朝倉書店、1996 年参照)の組成を有する細胞培養用培地を用いることができる。培養条件としては、細胞が培養可能ないかなる条件でもよい。一般に、培養温度は 33-37℃が好ましい。培養は、好

ましくは、5-10%の二酸化炭素ガスを満たしたインキュベーター内で実施される。

- 膵β細胞への分化能を有する骨髓由来間葉系細胞は、通常の組織培養用のプラスチック製培養皿に接着させて増殖させるのが好ましい。細胞が培養皿一面に増殖する頃、培地を除去し、トリプシン-EDTA 溶液を加えて細胞を浮遊させる。浮遊した細胞を、PBS
- 5 もしくは細胞培養用培地で洗浄後、細胞培養用培地で 5-20 倍に希釈し、新しい培養皿に添加して、さらに継代培養する。

### 3. 膵β細胞への分化能を有する間葉系細胞から膵β細胞の形成

- 上記 2 に示す膵β細胞への分化能を有する間葉系細胞の培養によって、該間葉系細胞
- 10 の増殖と共に、該間葉系細胞の分化による膵β細胞の形成が行われる。

- 膵β細胞への分化能を有する細胞からの膵β細胞の形成は、より好ましくは、膵β細胞形成剤として、(1)胎児の膵β細胞発生領域で発現している因子または胎児の膵β細胞発生段階において膵β細胞への分化に働く因子、および/または(2)膵β細胞への分化能を有する細胞の培養上清または該細胞から分化した膵β細胞の培養上清を利用して
- 15 実施することができる。また、前記(2)において、膵β細胞への分化能を有する間葉系細胞と共に支持細胞或いはインスリン分泌細胞に分化されうる細胞を共培養して同様に実施することができる。

- 上記(1)として記載の胎児の膵β細胞発生領域で発現している因子または胎児の膵β細胞発生段階において膵β細胞への分化に働く因子としては、サイトカイン、接着分子
- 20 /細胞外基質、生理活性物質、転写因子などをあげることができる。これらの膵β細胞形成剤は、一般には、膵β細胞への分化能を有する細胞の培養系内にこれらの適量を添加存在させることによって利用される。その添加量は、膵β細胞形成剤の種類に応じて適宜決定でき、特に限定的ではないが、一般には、約 1-400ng/ml 培養液の範囲とすることができる。

- 25 サイトカインとしては、膵β細胞への分化能を有する細胞に、膵β細胞の発生段階で膵β細胞への分化を促進する作用を有するものであればいかなるサイトカインでもよい。好ましいサイトカインの具体例としては、肝細胞増殖因子(HGF, Hepatocyte growth factor, NATURE MEDICINE, VOL. 6, NUMBER 3, MARCH 2000, 278-282, V. K. Ramiya, et al.; DIABETES, VOL. 48, 1999, 1013-1019, Beattie, G. M., et al.,;

- EDNOCRINOLOGY, VOL.137, NO.9, 3969-3976, Hirosato Mashima, et al.,; THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, VOL.275, NO.2, 14 January 2000; 1226-1232, Adolfo Garcia-Ocana, et al., など参照)、線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor (bFGF), FGF-2 (SCIENCE, VOL.284, 18, JUNE 1999, 1998-2003, Joonil Jung et al.,; NATURE, VOL.408, 14 DECEMBER 2000, 864-868, Alan W.Hart et al. など参照)、FGF-1 (SCIENCE, VOL. 284, 18, JUNE 1999, 1998-2003, Joonil Jung et al.; NATURE, VOL.408, 14 DECEMBER 2000, 864-868, Alan W. Hart et al. など参照)、インスリン、トランスフェリン、ヘパリン結合 EGF (heparin-binding epidermal growth factor, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, VOL.272, NO.46, 14 NOVEMBER, 1997, 29137-29143, Hideaki Kaneto et al. 参照)、EGF (DEVELOPMENT, VOL.112, 1991, 855-861, Hiroyuki Nogawa and Yu Takahashi; NATURE MEDICINE, VOL.6, NUMBER 3, MARCH 2000, 278-282, V. K. Ramiya et al. など参照)、ガストリン、TGF- $\beta$ 1 (DEVELOPMENT, VOL.120, 1994, 3451-3462, Sanvito F. et al. 参照)、インスリン様成長因子(IGF-1 など)、パラサイロイド・ホルモン関連蛋白(PTHrP, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, VOL.271, NO.2, 12 January 1996, 1200-1208, Rupangi C.Vasavada et al. 参照)、成長ホルモン(growth hormone)、プロラクチン、プラセンタル・ラクトジェン (Placental lactogen, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, VOL.275, NO.20, 19 May 2000, 15399-15406, Rupangi C.Vasavada et al. 参照)、グルカゴン様ペプチド 1 (Glucagon like peptide-1, DIABETES, VOL.49, MAY 2000, 741-748, Doris A.Stoffers et al.; DIABETES, VOL.50, APRIL 2001, 785-796, Hongxiang Hui et al. など参照)、Exendin-4 (DIABETES, VOL.48, DECEMBER, 1999, 2270-2276, Gang Xu et al.; DIABETES, VOL.49, MAY 2000, 741-748, Doris A.Stoffers et al. など参照)、KGF (keratinocyte growth factor, ケラチン細胞増殖因子、PNAS, VOL.97, NO.14, 5 JULY 2000, 7999-8004, Susan Bonner-Weir et al.; AM. J. PATHOL., VOL.145, 1994, 80-85, Yi E. et al. など参照)、TGA  $\alpha$  (DEVELOPMENT, VOL.112, 1991, 855-861, Hiroyuki Nogawa and Yu Takahashi)などを挙げることができる。

また、膵 $\beta$ 細胞への分化を抑制するサイトカインに対する阻害剤を用いることにより、膵 $\beta$ 細胞への分化能を有する細胞に、膵 $\beta$ 細胞の発生段階で膵 $\beta$ 細胞への分化を促進することも可能である。このような抑制するサイトカインとしては、線維芽細胞増殖因子

2 (FGF-2)などを例示でき、その阻害剤としては、例えば該サイトカインを中和する抗体、低分子化合物などが挙げられる。

接着分子/細胞外基質としては、膵β細胞の発生段階で膵β細胞発生領域で発現している各種の接着分子/細胞外基質を利用することができる。その具体例としては、例えばゼラチン、ラミニン (DIABETES, VOL. 49, JUNE 2000, 936-944, Christopher A. Crisera et al.; DIABETES, VOL. 48, APRIL 1999, 722-730, Fang-Xu Jiang et al.; J. Anat. VOL. 193, 1998, 1-21, Monique Aumailley and Neil Smyth)、コラーゲン (DIABETES, VOL. 45, AUGUST 1996, 1108-1114, Julie Kerr-Conte et al.; CELL TISSUE RES, VOL. 277, 1994, 115-121, Deijnen JH van et al.; J TISSUE CULT Method, VOL. 8, 1983, 31-36, Richards J et al.)、アガロース、フィブロネクチン、オルニチンなどの細胞外マトリックス蛋白質などを挙げるができる。例えば、ラミニンを利用する場合、該ラミニンでコートした培養皿で膵β細胞への分化能を有する細胞を培養すればよく、これによって該細胞の膵β細胞への分化を促進することができる。

生理活性物質としては、ニコチンアミド (NATURE MEDICINE, VOL. 6, NUMBER 3, MARCH 2000, 278-282, V.K. Ramiya et al.; TRANSPLANTATION, VOL. 68, NO. 11, 15 DECEMBER 1999, 1674-1683, Timo Otonkoski et al. 参照)、ベータセルリン (BETACELLULIN, DIABETES, VOL. 48, FEBRUARY 1999, 304-309, Hiroshige Mashima et al. 参照)、アクチピン A、プロゲステロン、プトレシン (Putrescine)、セレンウム (Selenium)、B27-Supplemented Neurobasal (Journal of Neuroscience Research, VOL. 35, 1993, 567-576, G. J. Brewer et al.)などの、膵β細胞の発生段階で膵β細胞への分化を促進する作用を奏し得るものを挙げるができる。例えばニコチンアミドは、1-10mM の濃度で用いられる。他のものも、同様に所望の分化促進作用を奏し得る濃度で利用することができる。

転写因子としては、PTF1a/PTF-P48 (NATURE GENETICS, VOL. 32, SEPTEMBER 2002, 128-134)、Isl-1 (NATURE, VOL. 385, 16 JANUARY 1997, 257-260, Ulf Ahlgren et al.)、Pdx-1/IPF-1 (NATURE, VOL. 371, 13 OCTOBER 1994, 606-609, Joergen Jonsson et al.; NATURE GENETICS, VOL. 15, JANUARY 1997, 106-110, Doris A. Stoffers et al.; NATURE, VOL. 408, 14 DECEMBER 2000, 864-868, Alan W. Hart et al.), Beta2/neuroD (GENES & DEVELOPMENT VOL. 11, 1997, 2323-2334, Francisco



J.Naya et al.), *ngn3* (DEVELOPMENT, VOL.127, 3533-3542, 2000, Valeire M.Schwitzgebel et al.), *PAX-6* (NATURE, VOL.387, 22 MAY 1997, 406-409, Luc St-Onge et al.), *PAX-4* (MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, VOL.19, NO.12, DECEMBER 1999, 8281-8291, Yoshio Fujitani et al.; MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, VOL.19, NO.12, DECEMBER 1999, 8272-8280, Stuart B.Smith et al.), *Hlxb-9* (NATURE GENETICS, VOL.23, SEPTEMBER 1999, 67-70, Hao Li et al.; NATURE GENETICS, VOL.23, SEPTEMBER 1999, 71-75, Kathleen A.Harrison et al.), *Nkx2.2* (DEVELOPMENT, VOL.125, 2213-2221, 1998, L.Sussel et al.), *Nkx6.1* (J. Histochem Cytochem, VOL.46, 1998, 707-715, Oster A. Jensen et al.), *HNF1 $\alpha$* ,  
5 *HNF1 $\beta$*  および *HNF4 $\alpha$*  (NATURE CELL BIOLOGY, VOL.2, DECEMBER 2000, 879-887, Chia-Ning Shen et al.), *Cyclopamine*, *HNF3 $\beta$* , *HNF6*などを挙げるができる。

上述した転写因子は、該因子をコードするDNAを膵 $\beta$ 細胞への分化能を有する細胞中に導入して、発現させることにより、膵 $\beta$ 細胞への分化を誘導させることができる。かかる転写因子をコードするDNAの細胞への導入および発現方法は、常法に従うことができる。  
15

また、膵 $\beta$ 細胞から取得した細胞外基質も、膵 $\beta$ 細胞形成剤として利用することができる。該細胞外基質は、膵 $\beta$ 細胞への分化能を有する細胞の培養上清または該細胞から分化した膵 $\beta$ 細胞の培養上清中に存在していることから、これらの培養上清の利用によっても膵 $\beta$ 細胞への分化能を有する細胞から膵 $\beta$ 細胞を誘導することができる。

20 例えば、膵 $\beta$ 細胞由来細胞外基質は、これをコートした細胞培養用培養皿にて所望細胞を培養するか、これを生成する膵 $\beta$ 細胞と所望細胞とを共培養するか、或いはこれを含む培養上清を培養培地に添加して所望細胞を培養することによって、膵 $\beta$ 細胞への分化能を有する細胞を膵 $\beta$ 細胞に分化誘導させることができる。

また、後記 4. に示す方法で得られる膵 $\beta$ 細胞分化誘導因子も膵 $\beta$ 細胞形成剤として  
25 利用することができ、この利用によっても、膵 $\beta$ 細胞への分化能を有する細胞を膵 $\beta$ 細胞に分化誘導することができる。

また、膵 $\beta$ 細胞への分化能を有する間葉系細胞を支持細胞と共培養して膵 $\beta$ 細胞に分化誘導することもできる。ここで、支持細胞とは、予め培養皿に単層培養された細胞上に、所望細胞を播種して膵 $\beta$ 細胞へ分化誘導する場合、予め培養皿に単層培養する細

胞を意味する。支持細胞としては、例えば、膵ランゲルハンス島を構成する $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$ 、PP細胞 (Pancreatic Polypeptide 細胞)、あるいは膵 $\beta$ 細胞由来細胞株、又はinsulinoma 由来細胞株などのインスリン分泌能を有する細胞を例示できる。支持細胞の培養は前記 2.に記載の膵 $\beta$ 細胞への分化能を有する細胞の培養と同様に実施できる。

5 具体的には、予め培養皿に単層培養された支持細胞上に、膵 $\beta$ 細胞への分化能を有する間葉系細胞を播種して、共培養することができる。さらに、上記膵 $\beta$ 細胞への分化能を有する間葉系細胞と共に支持細胞を共培養する際に、培養皿に単層培養された支持細胞を、パラホルムアルデヒド、エタノール、10%中性緩衝ホルマリン液などの固定液で固定した後に、膵 $\beta$ 細胞への分化能を有する間葉系細胞と共培養することもできる。

10 また、上記共培養において、支持細胞に換えて、インスリン分泌細胞に分化されうる細胞を用いることもできる。インスリン分泌細胞に分化されうる細胞としては、胚性幹細胞、膵幹細胞、小腸上皮幹細胞、肝臓由来幹細胞および羊膜細胞が例示することができる。

また、培養皿に単層培養された間葉系細胞上に、インスリン分泌細胞に分化されうる細胞を播き、共培養してインスリン分泌細胞に分化する方法を行うこともできる。インスリン分泌細胞に分化されうる細胞としては、胚性幹細胞、膵幹細胞、小腸上皮幹細胞、肝臓由来幹細胞及び羊膜細胞があげられる。

#### 4. 膵 $\beta$ 細胞分化誘導因子の取得

20 膵 $\beta$ 細胞分化誘導因子の取得方法としては、インスリンを産生する細胞の培養上清に、各種プロテアーゼ阻害剤を添加して、透析、塩析、クロマトグラフィーなどを組み合わせた操作を実施することにより取得することができる。

さらに該膵 $\beta$ 細胞分化誘導因子の遺伝子は、マイクロシーケンサーを用いて、上記膵 $\beta$ 細胞分化誘導因子の部分アミノ酸配列を決定し、該アミノ酸配列に基づき設計した  
25 DNA プローブを用いて、該細胞より作製した cDNA ライブラリーをスクリーニングすることによって取得することができる。

かくして得られる膵 $\beta$ 細胞分化誘導因子は、その利用によって、膵 $\beta$ 細胞への分化能を有する細胞を膵 $\beta$ 細胞に分化誘導することができる。例えば、これを、膵 $\beta$ 細胞への分化能を有する細胞の培養用培地に添加して膵 $\beta$ 細胞への分化能を有する細胞を培養す

ることによって、所望の膵β細胞を得ることができる。培養条件は、前記 2. に記載した通りである。培地への添加量は、通常、約 1-400ng/ml 培地の範囲から適宜選択することができる。

5     5. 膵β細胞を含む膵β細胞再生薬または糖尿病などの耐糖能異常に基づく疾患の治療薬

本発明方法に従い分化誘導された膵β細胞或いはその前駆細胞は、膵β細胞再生薬また耐糖能異常に基づく疾患、例えば耐糖能異常に起因する疾患、例えば、糖尿病またはそれに準ずる Impaired glucose tolerance などの各種疾患の治療薬として有用である。

- 10     膵β細胞再生薬および耐糖能異常疾患治療剤は、膵β細胞またはその前駆細胞(膵β細胞への分化能を有する細胞)を高純度で含むものであればよく、また、これを適用すべき患者の膵β細胞の障害部位ならび大きさに応じて、該細胞を増殖させたもの、好ましくは、膵β細胞への分化能を有する細胞から分化させたインスリン産生能を持つβ細胞様細胞を含むものが用いられる。

- 15     この膵β細胞再生薬の有効成分とする本発明細胞は、例えば患者の骨髓液中から前記 1-(1)に示す密度勾配遠心分離法、後記 8. に示す膵β細胞への分化能を有する細胞を特異的に認識する抗体を用いたパニング法[J. Immunol., 141(8), 2797-2800 (1988)]もしくは FACS 法[Int. Immunol., 10(3), 275-283 (1998)]、または膵β細胞への分化能を有する細胞に特異的な遺伝子のプロモーターを用いたレポーター系を構築する方法により、製造および精製することができる。

また該薬剤の有効成分とする細胞には、後記 6. に示す膵β細胞形成剤を用いて、該膵β細胞への分化能を有する細胞を膵β細胞へ分化誘導させた細胞、高齢者の骨髓から取得した骨髓由来間葉系細胞に、後記 11. に示す不死化方法を適用して、細胞分裂能を賦活させた膵β細胞への分化能を有する細胞も含まれる。

- 25     本発明膵β細胞再生薬および耐糖能異常疾患治療剤は、通常、処置を必要とする患者に約  $10^5$ - $10^8$ 細胞/kg 体重、好ましくは約  $10^6$ - $10^7$ 細胞/kg 体重の範囲で投与することができる。投与経路は、特に制限されないが、好ましくは、門脈注射により障害部位に輸送する方法を挙げることができる。

## 6. 膵β細胞形成剤

本発明の膵β細胞形成剤は、胎児の膵β細胞発生領域で発現している因子あるいは胎児の膵β細胞発生段階で膵β細胞への分化に働く因子および膵β細胞分化誘導因子の少なくとも一種を有効成分として含有しており、その利用によって膵β細胞への分化能を有する細胞を膵β細胞へ分化誘導させることができる。

該膵β細胞形成剤としては、前記 3. に詳述した、サイトカイン、接着分子/細胞外基質、生理活性物質、転写因子などをあげることができる。

また、前記 2.2. に示された膵ランゲルハンス島を構成するα、β、δ、PP細胞 (Pancreatic Polypeptide 細胞)、あるいは膵β細胞由来細胞株、又は insulinoma 由来細胞株などのインスリン分泌能を有する細胞などの支持細胞や胚性幹細胞、膵幹細胞、小腸上皮幹細胞、肝臓由来幹細胞および羊膜細胞などのインスリン分泌細胞に分化される細胞も膵β細胞形成剤として利用することができる。

これらは、一般には 1-400ng/ml 程度の範囲で用いることができる。好ましくは、サイトカインは、10-40ng/ml の濃度で用いられる。生理活性物質としてのニコチンアミドは、例えば  $10^{-3}M$  の濃度で用いられる。接着分子/細胞外基質は、例えばラミニンの場合、これでコートした培養皿を利用して、該培養皿で膵β細胞への分化能を有する細胞を培養することにより膵β細胞への分化を促進することができる。

また、本発明の膵β細胞形成剤には、前記 4 に記載の膵β細胞分化誘導因子または該膵β細胞分化誘導因子の遺伝子を含むものも包含される。以下、これらにつき詳述する。

### 20 (1) 膵β細胞分化誘導因子をコードする遺伝子を含む膵β細胞形成剤

膵β細胞分化誘導因子をコードする遺伝子を有効成分として含む膵β細胞形成剤について詳述する。

まず、膵β細胞分化誘導因子の遺伝子 DNA 断片あるいは全長 cDNA をウイルスベクタープラスミド内のプロモーターの下流に挿入して、組換えウイルスベクタープラスミドを造成する。ここでウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなど、公知の各種のものを利用できる。

次いで、該組換えウイルスベクタープラスミドを、該ウイルスベクタープラスミドに適合したパッケージング細胞に導入する。ここでパッケージング細胞としては、ウイル

スのパッケージングに必要な蛋白質をコードする遺伝子の少なくとも1つを欠損している組換えウイルスベクタープラスミドの該欠損する蛋白質を補給できる細胞であればいかなるものも用いることができる。例えば該パッケージング細胞としては、ヒト腎臓由来のHEK293細胞、マウス線維芽細胞NIH3T3などを用いることができる。

- 5     パッケージング細胞で補給する蛋白質としては、レトロウイルスベクターの場合はマウスレトロウイルス由来の gag、pol、env などの蛋白質、レンチウイルスベクターの場合は HIV ウイルス由来の gag、pol、env、vpr、vpu、vif、tat、rev、nef などの蛋白質、アデノウイルスベクターの場合はアデノウイルス由来の E1A、E1B などの蛋白質、アデノ随伴ウイルスベクターの場合は Rep(p5, p19, p40)、Vp(Cap) などの蛋白質を用いること  
10    ができる。

ウイルスベクタープラスミドとしては、上記パッケージング細胞において組換えウイルスが生産でき、MODY 疾患の原因遺伝子に対する野生型遺伝子を膵β細胞で転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。その具体例としては、例えば MFG [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 6733-6737 (1995)]、pBabePuro [Nucleic  
15    Acids Research, 18, 3587-3596 (1990)]、LL-CG、CL-CG、CS-CG、CLG [Journal of Virology, 72, 8150-8157 (1998)]、pAdex1 [Nucleic Acids Res., 23, 3816-3821 (1995)]などのウイルスベクタープラスミドを挙げる事ができる。

プロモーターとしては、ヒト組織中で発現できるものであればいずれも用いることができる。例えば、サイトメガロウイルス (ヒト CMV) の IE(immediate early) 遺伝子のプロ  
20    モーター、SV40 の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、SRαプロモーターなどを挙げる事ができる。また、ヒト CMV の IE 遺伝子のエンハンサーが上記プロモーターと共に用い得る。また、インスリン遺伝子のような膵β細胞特異的な遺伝子のプロモーターの利用によれば、膵β細胞で特異的に目的の遺伝子を発現させることができる。

- 25    上記組換えウイルスベクタープラスミドを上記パッケージング細胞に導入する方法 (組換えウイルスベクターの生産方法) としては、例えば、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)] などを挙げる事ができる。

かくして得られる組換えウイルスベクターは、これを遺伝子治療剤に用いる基剤と共に調合して、膵β細胞形成剤とすることができる。その調合は文献記載の方法[Nature

- Genet., 8, 42 (1994)]に従うことができる。遺伝子治療剤に用いる基剤としては、通常注射剤に用いる基剤であればいかなるものでも用いることができる。例えば、蒸留水、塩化ナトリウム、塩化ナトリウムと無機塩との混合物などの塩溶液、マンニトール、ラクトース、デキストラン、グルコースなどの溶液、グリシン、アルギニンなどのアミノ酸溶液、有機酸溶液または塩溶液とグルコース溶液との混合溶液などがあげられる。また常法に従い、これらの基剤と共に、助剤として例えば浸透圧調整剤、pH調整剤、ゴマ油、ダイズ油などの植物油またはレシチン、非イオン界面活性剤などの界面活性剤などを用いて、溶液、懸濁液、分散液としての注射剤を調製してもよい。これらの注射剤を、粉末化、凍結乾燥などの操作により用時溶解用製剤として調製することもできる。
- 10 かくして得られる膵β細胞形成剤は、これが液体の場合はそのまま、固体の場合は治療の直前に必要により滅菌処理をした上記基剤に溶解して、遺伝子治療に使用することができる。該膵β細胞形成剤は、カテーテルなどを用いて局所的に投与する方法などによって遺伝子治療に実用することができる。

- 上述した組換えウイルスベクターを試験管内で膵β細胞への分化能を有する細胞に感染させて得られる感染細胞を上述した膵β細胞形成剤として患者に投与することによっても、本発明遺伝子治療を実施することができる。また、上述した組換えウイルスベクターを患者の患部に直接投与することによっても、所望の遺伝子治療を実施することができる。

20 (2) 蛋白質を有効成分とする膵β細胞形成剤

以下、膵β細胞分化誘導因子を有効成分とする膵β細胞形成剤について詳述する。

- 膵β細胞分化誘導因子の完全長 cDNA をもとに、必要に応じて、該蛋白質をコードする部分を含む適当な長さの DNA 断片を調製する。該 DNA 断片または完全長 cDNA を発現ベクター内のプロモーターの下流に挿入することにより、該蛋白質の組換え発現ベクターを造成する。該組換え発現ベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞内に導入する。

宿主細胞としては、目的とする DNA を発現できるものは全て用いることができる。例えば、エシェリヒア (*Escherichia*) 属、セラチア (*Serratia*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、ブレヴィバクテリウム (*Brevibacterium*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、バチルス (*Bacillus*) 属、マイクロバクテリウム (*Microbacterium*) 属

などに属する細菌、クルイベロミセス (*Kluyveromyces*) 属、サッカロマイセス (*Saccharomyces*) 属、シゾサッカロマイセス (*Shizosaccharomyces*) 属、トリコスポロン (*Trichosporon*) 属、シワニオミセス (*Schwanniomyces*) 属などに属する酵母や動物細胞、昆虫細胞などを用いることができる。

- 5 宿主細胞の具体例としては、例えば *Escherichia coli* XL1-Blue、*Escherichia coli* XL2-Blue、*Escherichia coli* DH1、*Escherichia coli* MC1000、*Escherichia coli* KY3276、*Escherichia coli* W1485、*Escherichia coli* JM109、*Escherichia coli* HB101、*Escherichia coli* No.49、*Escherichia coli* W3110、*Escherichia coli* NY49、*Bacillus subtilis*、*Bacillus amyloliquefaciens*、*Brevibacterium ammoniagenes*、
  - 10 *Brevibacterium immariophilum* ATCC14068、*Brevibacterium saccharolyticum* ATCC14066、*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032、*Corynebacterium glutamicum* ATCC14067、*Corynebacterium glutamicum* ATCC13869、*Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870、*Microbacterium ammoniaphilum* ATCC15354、*Pseudomonas* sp. D-0110 などをあげることができる。
  - 15 発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能なまたは染色体中への組み込みが可能で、膵β細胞分化誘導因子の遺伝子 DNA を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。
- 細菌を宿主細胞として用いる場合は、膵β細胞分化誘導因子の組換え発現ベクターは該細菌中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、膵β細胞分化誘導因子をコードする DNA および転写終結配列より構成された組換え発現ベクターであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。
- 20 発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2 (いずれもベーリンガーマンハイム社より市販)、pKK233-2 (Amersham Pharmacia Biotech 社製)、pSE280 (Invitrogen 社製)、pGEMEX-1 (Promega 社製)、pQE-8 (QIAGEN 社製)、pKYP10 [特開
  - 25 昭 58-110600]、pKYP200 [Agricultural Biological Chemistry, 48, 669 (1984)]、pLSAI [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescript II SK(-) (Stratagene 社製)、pGEX (Amersham Pharmacia Biotech 社製)、pET-3 (Novagen 社製)、pTerm2 (USP4686191、USP4939094、USP5160735)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pEG400 [J. Bacteriol., 172, 2392

(1990)]などを例示することができる。

発現ベクターとしては、リボソーム結合配列であるシャインーダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間を適当な距離 (例えば 6-18 塩基) に調節したものをを用いることが好ましい。

- 5 プロモーターとしては、宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trp プロモーター (Ptrp)、lac プロモーター (Plac)、P<sub>L</sub> プロモーター、P<sub>R</sub> プロモーター、T7 プロモーターなどの大腸菌やファージなどに由来するプロモーター、SP01 プロモーター、SP02 プロモーター、penP プロモーターなどをあげることができる。また Ptrp を 2 つ直列させたプロモーター (Ptrp×2)、lac プロモーター、letI プロモーター [Gene, 44, 29 (1986)]、lacT7 プロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーターなども用いることができる。

酵母細胞分化誘導因子をコードする部分の塩基配列を、宿主の発現に最適なコドンとなるように置換することにより、目的とする蛋白質の生産率を向上させることができる。

- 15 酵母細胞分化誘導因子の発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、好適には構造遺伝子直下に転写終結配列を配置することが望ましい。

組換えベクターの導入方法としては、宿主細胞に DNA を導入する方法であればいずれも用いることができる。例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)]、Gene, 17, 107 (1982) や Molecular & General Genetics, 168, 111 (1979) に記載の方法などをあげることができる。

- 20 酵母を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEpl3 (ATCC37115)、YEpl24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419)、pHS19、pHS15などを例示することができる。

- プロモーターとしては、酵母中で発現できるものであればいかなるものでもよく、例えば、PH05 プロモーター、PGK プロモーター、GAP プロモーター、ADH プロモーター、gal 1 プロモーター、gal 10 プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、MF $\alpha$  1 プロモーター、CUP 1 プロモーターなどをあげることができる。

宿主細胞としては、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、クリュイベロミセス・ラクチス (*Kluyveromyces lactis*)、トリコスポロン・ブルランス (*Trichosporon*



pullulans)、シュワニオミセス・アルビウス (Schwanniomyces alluvius)などをあげる  
ことができる。

組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用  
いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods in Enzymol., 194,  
5 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929  
(1978)]、酢酸リチウム法 [J. Bacteriol., 153, 163 (1983), Proc. Natl. Acad. Sci.  
USA, 75, 1929 (1978)]などを挙げるることができる。

動物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、  
pCDNA1 (Invitrogen 社製)、pCDM8 (Invitrogen 社製)、pAGE107 [Cytotechnology, 3,  
10 133 (1990)]、pCDM8 [Nature, 329, 840 (1987)]、pCDNA1/Amp (Invitrogen 社製)、  
pREP4 (Invitrogen 社製)、pAGE103 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、pAGE210 など  
を例示することができる。

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることが  
でき、例えば、サイトメガロウイルス (ヒト CMV) の IE (immediate early) 遺伝子のプロ  
15 モーター、SV40 の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネ  
インプロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、SR $\alpha$ プロモーターなどをあげ  
ることができる。また、ヒト CMV の IE 遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用  
いてもよい。

宿主細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ (Namalwa) 細胞、サルの細胞である  
20 COS 細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞である CHO 細胞などを用いることができる。

組換えベクターの導入法としては、動物細胞にDNAを導入できるいかなる方法も用い  
ることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133  
(1990)]、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 7413 (1987),  
Virology, 52, 456 (1973)]などを用いることができる。

25 昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばバキュロウイルス・エクスプレッショ  
ン・ベクターズ、ア・ラボラトリー・マニュアル [Baculovirus Expression Vectors, A  
Laboratory Manual; W.H. Freeman and Company, New York (1992)]、カレント・プロ  
トコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー サプリメント [Current protocols in  
molecular biology, supplement, 1-38 (1987-1997), Bio/Technology, 6, 47 (1988)]

などに記載された方法によって、蛋白質を発現することができる。

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して、昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、蛋白質を発現させることができる。

- 5     該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII（ともに Invitrogen 社製）などを挙げるることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) などを用いることができる。

- 10    昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperda の卵巣細胞である Sf9、Sf21 [Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W.H. Freeman and Company, New York, (1992)]、Trichoplusia ni の卵巣細胞である High 5 (Invitrogen 社製) などを用いることができる。

- 組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上  
15    記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)]などを挙げるることができる。

- 遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング 第2版 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] に記載されている方法などに準じて、分泌生産、融合蛋白質発現などを行うことができる。

20    酵母、動物細胞または昆虫細胞により発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が付加された蛋白質を得ることができる。

- 膵β細胞分化誘導因子をコードする DNA を組み込んだ組換え体 DNA を保有する形質転換体を培地に培養し、培養物中に膵β細胞分化誘導因子を生成蓄積させ、該培養物より  
25    該蛋白質を採取することにより、膵β細胞分化誘導因子を製造することができる。

膵β細胞分化誘導因子を産生する形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

大腸菌などの原核生物あるいは酵母などの真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、該宿主が資化し得る炭素源、窒素源、無機物などを含有し、

形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれでもよい。

炭素源としては、それぞれの宿主が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含む糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物などの炭水化物、酢酸、プロピオン酸などの有機酸、エタノール、プロパノールなどの

5 アルコール類を用いることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウムなどの各種無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物などを用いることができる。

10 無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウムなどを用いることができる。

培養は、振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下で行う。培養温度は 15-40℃がよく、培養時間は、通常 16 時間-7 日間とすることができる。培養中、pH は

15 3.0-9.0 に保持するのがよい。pH の調整は、無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行い得る。また培養中に必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリンなどの抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、

20 lac プロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド (IPTG) などを、trp プロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸 (IAA) などを培地に添加してもよい。

動物細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用

25 されている RPMI1640 培地 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)]、Eagle の MEM 培地 [Science, 122, 501 (1952)]、ダルベッコ改変 MEM 培地 [Virology, 8, 396 (1959)]、199 培地 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)] またはこれら培地に牛胎児血清などを添加した培地などを用いることができる。

培養は、通常 pH6-8、30-40℃、5%CO<sub>2</sub>存在下の条件下で 1-7 日間行うことができる。  
培養中、必要に応じて、カナマイシン、ペニシリンなどの抗生物質を培地に添加してもよい。

- 5 昆虫細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されている TNM-FH 培地 (Pharmingen 社製)、Sf-900 II SFM 培地 (Life Technologies 社製)、ExCell400、ExCell405 (いずれも JRH Biosciences 社製)、Grace's Insect Medium [Grace, T.C.C., Nature, 195, 788 (1962)] などを用いることができる。

培養は、通常 pH6-7、25-30℃の条件下で、1-5 日間行うことができる。

- また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシンなどの抗生物質を培地に添加してもよい。
- 10 上述の形質転換体の培養物から、膵β細胞分化誘導因子を単離精製するには、通常の蛋白質の単離、精製法を用いればよい。例えば、膵β細胞分化誘導因子が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液に懸濁させた後、超音波破碎機などにより細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離して得られる上清から、通常の蛋白質の単離精製法、例えば、溶媒抽出法、硫酸などによる塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル (DEA)-セファロース、DIAION HPA-75 (三菱化学社製)などの樹脂を用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF (Amersham Pharmacia Biotech 社製)などの樹脂を用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロースなどの樹脂を用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲル濾過法、
- 15 アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動などの電気泳動法などの手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

- また、該蛋白質が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、細胞を回収後、破碎し、遠心分離することにより、沈殿画分として蛋白質の不溶体を回収する。回収した該蛋白質の不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。該可溶化液を、希釈あるいは透析により、該可溶化液中の蛋白質変性剤の濃度を下げることににより、該蛋白質の構造を正常な立体構造に戻した後、上記と同様の単離精製法により該蛋白質の精製標品を得る。
- 25

膵β細胞分化誘導因子またはその糖修飾体などの誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清から、該蛋白質またはその糖鎖付加体などの誘導体を回収することができ

る。例えば、培養物から遠心分離などの手法により培養上清を回収し、該培養上清から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

また、上記各方法により発現させた蛋白質は、そのアミノ酸配列に基づいて、別個に Fmoc 法(フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、tBoc 法(t-ブチルオキシカルボニル法)などの化学合成法に従って製造することができる。また、米国 Advanced ChemTech 社製、Perkin-Elmer 社製、Amersham Pharmacia Biotech 社製、米国 Protein Technology Instrument 社製、米国 Synthecell-Vega 社製、米国 PerSeptive 社製、島津製作所社製などのペプチド合成機を利用して合成することもできる。

膵β細胞への分化を誘導できる蛋白質は、前記 6-(1)と同様にして膵β細胞形成剤として実用できる。

#### 7. 先天性遺伝子疾患の治療への利用

糖尿病などの耐糖能異常に基づく疾患の中には、単一遺伝子の変異により、本来膵β細胞の分化または維持に必要な蛋白質の一部が欠損するために耐糖能異常となる一群がある。このような疾患の代表例には、MODY(maturity onset diabetes of the young)が含まれる。この疾患は、ミオシン、トロポニン、トロポミオシン、電位依存性 Na チャネル、K チャネル、フィブリン、エラスティン、ミトコンドリア、ジストロフィンなどの遺伝子異常が原因であることが知られている。

上記疾患患者を治療する方法としては、疾患患者より膵β細胞への分化能を有する細胞を取得し、該細胞に正常な遺伝子を導入したのち、膵β細胞に移植する方法があげられる。正常な遺伝子は、前記 6-(1)に記載した遺伝子治療用ベクターに挿入した後、膵β細胞への分化能を有する細胞に導入することができる。

#### 8. 膵β細胞への分化能を有する細胞特異的な表面抗原を認識する抗体

以下、本発明膵β細胞への分化能を有する細胞が発現している表面抗原を認識する抗体について詳述する。

本発明膵β細胞への分化能を有する細胞で特異的に発現している表面抗原を認識する抗体は、耐糖能異常による疾患の細胞治療を実施する上で必要な膵β細胞への分化能を有する細胞の純度検定や精製に用いることができる。

該抗体を取得する方法としては、本発明の脾β細胞への分化能を有する細胞  $3-5 \times 10^5$  細胞/匹あるいは該細胞から調製した細胞膜面分 1-10mg/匹程度を抗原として、ウサギ、ヤギ、3-20 週齢ラット、マウス、ハムスターなどの非ヒト哺乳動物の皮下、静脈内または腹腔内に、適当なアジュバント[例えば、フロインドの完全アジュバント (Complete Freund's Adjuvant) または水酸化アルミニウムゲル、百日咳菌ワクチンなど]とともに投与する。

該抗原の投与は、1 回目の投与の後 1-2 週間おきに 3-10 回行う。各投与後、3-7 日目に眼底静脈叢より採血し、得られる血清が免疫に用いた抗原と反応するか否かを酵素免疫法(ELISA 法: 医学書院刊、1976 年、Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)などで調べる。

免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示した非ヒト哺乳動物を、血清または抗体産生細胞の供給源とする。

ポリクローナル抗体は、該血清を分離、精製することにより調製できる。

モノクローナル抗体は、該抗体産生細胞と非ヒト哺乳動物由来の骨髓腫細胞とを融合させてハイブリドーマを作製し、該ハイブリドーマを培養するか、動物に投与して該動物を腹水癌化させ、該培養液または腹水を分離、精製することにより調製することができる。

抗体産生細胞としては、脾細胞、リンパ節、末梢血中の抗体産生細胞、特に脾細胞が好適に用いられる。

骨髓腫細胞としては、8-アザグアニン耐性マウス(BALB/c 由来)骨髓腫細胞株である P3-X63Ag8-U1(P3-U1)株 [Current Topics in Microbiology and Immunology, 18, 1 (1978)]、P3-NS1/1-Ag41(NS-1)株 [European J. Immunology, 6, 511 (1976)]、SP2/O-Ag14(SP-2)株 [Nature, 276, 269 (1978)]、P3-X63-Ag8653(653)株 [J. Immunology, 123, 1548 (1979)]、P3-X63-Ag8(X63)株 [Nature, 256, 495 (1975)]などのマウス由来の株化細胞が好適に用いられる。

ハイブリドーマ細胞は、以下の方法により作製できる。即ち、抗体産生細胞と骨髓腫細胞を混合し、HAT 培地(正常培地にヒポキサンチン、チミジンおよびアミノプテリンを加えた培地)に懸濁した後、7-14 日間培養する。培養後、培養上清の一部を採り酵素免疫測定法などにより抗原に反応し抗原を含まない蛋白質には反応しない細胞を選択す

る。次いで、限界希釈法によりクローニングを行い、酵素免疫測定法により安定して高い抗体価の認められたものをモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞として選択する。

- ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を分離、精製する方法としては、遠心  
5 分離、硫酸沈殿、カプリル酸沈殿や、DEAE-セファロースカラム、陰イオン交換カラム、  
プロテイン A または G-カラム、ゲル濾過カラムなどを用いるクロマトグラフィーなど  
を、単独または組み合わせて行う方法があげられる。

- 上記方法で取得した該脾β細胞への分化能を有する細胞で発現している表面抗原を認  
識する抗体を用いて、検体細胞に対する反応性と、造血系幹細胞、神経系幹細胞などの  
10 対照となる細胞に対する反応性とを比較することで、検体細胞が上記表面抗原を発現し  
ているかどうかを容易に検定することができる。

9. 脾β細胞への分化能を有する細胞で発現している表面抗原および該表面抗原をコー  
ドする遺伝子の取得

- 15 脾β細胞への分化能を有する細胞で特異的に発現している表面抗原遺伝子の取得方法  
としては、二つの異なる由来のサンプル間で異なる発現形態を取る遺伝子を取得する方  
法であるサブトラクション法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5738-5742 (1988)]や、  
Representational difference analysis[Nucleic Acids Research, 22, 5640-5648  
(1994)]による方法をあげることができる。

- 20 まず、脾β細胞への分化能を有する細胞より作製した cDNA ライブラリーを、造血系  
幹細胞や神経系幹細胞などの脾β細胞への分化能を有する細胞以外の対照細胞より取得  
した mRNA を用いてサブトラクションを行う。脾β細胞への分化能を有する細胞特異的  
な遺伝子を濃縮した差分化 cDNA ライブラリーを調製した後、該差分化 cDNA ライブラリ  
ーの挿入 cDNA 配列を 5' 末端側よりランダムに塩基配列解析を行い、分泌シグナル配列  
25 を持つものだけを選択する（ランダム配列解析）。このようにして得られた cDNA の全長  
塩基配列を決定することにより、該 cDNA がコードする蛋白質が分泌蛋白質か膜蛋白質  
かを区別することができる。

上記の方法において、ランダム配列解析の代わりに、シグナルシーケンストラップ法  
も用いることもできる [Science, 261, 600-603 (1993); Nature Biotechnology, 17,

487-490 (1999)]. シグナルシーケンスストラップ法とは、分泌シグナル配列をもつ遺伝子を選択的にスクリーニングする方法である。

効率よく特異的な表面抗原を取得するためには、シグナルシーケンスストラップライブラリーをサブトラクションが行い得るベクターを用いて作製し、膵β細胞への分化能を  
5 有する細胞から作製したシグナルシーケンスストラップライブラリーを造血系幹細胞や神経系幹細胞などの対照となる細胞より取得した mRNA を用いてサブトラクションを行う方法が望ましい。このようにして取得された分泌シグナル配列を含む DNA 断片は全長 cDNA をクローン化するためのプローブとして用いることができる。

全長 cDNA はその全長塩基配列を解析することで、該 cDNA がコードする蛋白質が分泌  
10 蛋白質か膜蛋白質かを区別することができる。

ランダム配列解析あるいはシグナルシーケンスストラップ法を用いた場合でも、得られたクローンが膜蛋白質をコードする場合は、塩基配列から類推されるアミノ酸配列に基づき合成ペプチドを作製し、該合成ペプチドを抗原として上記方法により特異的な抗体  
15 を取得することができる。

また、膜蛋白質の場合は、受容体をコードしているものがある。このような受容体は膵β細胞への分化能を有する細胞の特異的な増殖または膵β細胞への分化の調節に働いている可能性があり、当該受容体のリガンドの探索に用いることができる。分泌蛋白質  
20 の場合は、直接膵β細胞への分化能を有する細胞を増殖あるいは分化させるために用いることができる。

#### 10. 膵β細胞の形成を促進する候補物質のスクリーニング

本発明は、膵β細胞の形成(分化誘導)を促進する活性を有する候補物質のスクリーニング方法をも提供する。該スクリーニング方法は、膵β細胞への分化能を有する間葉系細胞を無血清培地中で培養させる際に、候補物質を培養系内に添加存在させ、その存在  
25 が膵β細胞の形成を促進するか否か、即ち分化誘導される膵β細胞レベルを調べることで実施できる。

候補物質としては、各種サイトカイン、増殖因子などの分泌蛋白質、細胞接着分子/細胞外基質などの膜結合蛋白質、組織抽出液、合成ペプチド、合成化合物、微生物培養液などを挙げることができる。



膵β細胞乃至その前駆細胞の増殖能力はコロニー形成能や BrdU の取り込みなどで調べることができる。

コロニー形成能は、本発明の膵β細胞への分化能を有する細胞を低密度で播種することにより調べることができる。

- 5     BrdU の取り込みは、BrdU を特異的に認識する抗体を用いた免疫染色により調べることができる。

膵β細胞への分化を評価する方法としては、細胞のインスリン産生を指標とする方法、細胞内に導入したレポーター遺伝子の発現を指標とする方法などがあげられる。

- 10    レポーター遺伝子の発現を指標とする方法は、膵β細胞で特異的に発現する遺伝子のプロモーターとレポーター遺伝子とを組み込んだベクターDNA を膵β細胞への分化能を有する細胞に導入し、該細胞を用いてレポーター遺伝子の発現を調べる方法である。

レポーター遺伝子としては、GFP (Green fluorescent protein)、ルシフェラーゼ、ベクターガラクトシダーゼをコードする遺伝子などがあげられる。

- 15    膵β細胞で特異的に発現する遺伝子のプロモーターとしては、インスリンがあげられる。

#### 11. 膵β細胞への分化能を有する細胞の不老化

- 20    糖尿病などの耐糖能異常に基づく疾患などの耐糖能異常に基づく疾患の患者、特に高齢者に対して本発明の治療薬を投与する場合、本発明の膵β細胞への分化能を有する細胞をガン化させずに細胞分裂の回数を増やすことが望ましい。

細胞をガン化させずに細胞分裂の回数を増やす方法としては、テロメラーゼを本発明の膵β細胞への分化能を有する細胞に発現させる方法をあげることができる。

- 25    テロメラーゼを本発明の膵β細胞への分化能を有する細胞に発現させる方法としては、テロメラーゼの触媒サブユニットである TERT 遺伝子をレトロウイルスベクターに導入し、該ベクターを膵β細胞への分化能を有する細胞に導入する方法、膵β細胞への分化能を有する細胞に内在する TERT 遺伝子を誘導発現させる因子を膵β細胞への分化能を有する細胞に投与する方法、TERT 遺伝子を誘導発現させる因子をコードする DNA を含むベクターを膵β細胞への分化能を有する細胞に導入する方法などをあげることができる。

上述の TERT 遺伝子を誘導発現させる因子は、TERT 遺伝子プロモーターと GFP (Green Fluorescent protein)、ルシフェラーゼあるいはベクターガラクトシダーゼなどのレポーター遺伝子とを組み込んだベクターDNA を脾β細胞への分化能を有する細胞に導入することにより、TERT 遺伝子を誘導発現させる因子を選別することができる。

5

#### 12. 脾β細胞への分化能を有する細胞を抗体を用いて分離する方法

生体内から取り出した各種組織から目的の表面抗原を発現している細胞を取得する方法としては、ソーティング機能を有したフローサイトメーターを用いる方法、磁気ビーズを用いる方法があげられる。

- 10    フローサイトメーターのソーティングの方式としては、水滴荷電方式、セルキャプチャー方式などがあげられる (フローサイトメーター自由自在、p14-23、秀潤社、1999年)。どちらの方法も、細胞の表面に発現している分子に結合した抗体から発せられる蛍光強度を電気信号に変換することにより抗原の発現量を定量することができる。また、使用する蛍光の種類を組み合わせることで、複数の表面抗原を利用して分離することも
- 15    可能である。蛍光としては、FITC (fluorescein isothiocyanate)、PE (phycoerythrin)、APC (Allo-phycoyanin)、TR (TexasRed)、Cy3、CyChrome、Red613、Red670、PerCP、TRI-Color、QuantumRed などがあげられる (フローサイトメーター自由自在、p. 3-13、秀潤社、1999年)。

- 20    染色方法としては、生体内から取り出した各種組織、具体的には骨髓または臍帯血から、遠心分離などの方法で細胞を分離した後、直接抗体で染色する方法、一度適当な培地中で培養・増殖を行った後に抗体で染色する方法があげられる。

- 細胞の染色はまず、表面抗原を認識する一次抗体と目的の細胞サンプルを混合し、氷上で 30 分間-1 時間インキュベートする。一次抗体が蛍光で標識されている場合には、洗浄後フローサイトメーターで分離を行う。一次抗体が蛍光標識されていない場合には、
- 25    洗浄後一次抗体に対して結合活性を有する蛍光標識された二次抗体と一次抗体が反応した細胞とを混合し、再び氷上で 30 分間-1 時間インキュベートする。洗浄後、一次抗体と二次抗体で染色された細胞をフローサイトメーターで分離する。

磁気ビーズを用いる方法では、目的の表面抗原を発現している細胞を大量に分離することができる。分離の純度は上述のフローサイトメーターを用いる方法には及ばないが、

精製を繰り返すことにより、十分高い細胞純度を確保することができる。

細胞に一次抗体を反応させた後、細胞と反応しなかった一次抗体を除去し、一次抗体と特異的に結合する磁気ビーズを結合させた二次抗体を結合させる。残存する二次抗体を洗浄除去した細胞は磁石を設置したスタンドで分離することができる。これらの操作  
5 に必要な材料および装置は DYNAL 社から入手することができる。

磁気ビーズを用いる方法は、細胞サンプル中より不要な細胞を除去するのにも同様に利用することができる。不要な細胞をより効率的に除去するには Stem Cell Technologies Inc (Vancouver, Canada) より販売されている StemSep 法を用いることができる。

10 上述の方法で用いられる抗体としては、前記 8. で取得した抗体または造血系細胞の表面抗原である CD34、CD117、CD14、CD45、CD90、Sca-1、Ly6c、Ly6g を認識する抗体、血管内皮細胞の表面抗原である Flk-1、CD31、CD105、CD144 を認識する抗体、間葉系細胞の表面抗原である CD140 を認識する抗体、インテグリンの表面抗原である CD49b、CD49d、CD29、CD41 を認識する抗体、マトリックス受容体である CD54、CD102、CD106、  
15 CD44 を認識する抗体があげられる。これらの抗体を組み合わせることで、より高い純度で目的の細胞を取得することができる。

具体的には、CD34 陰性、CD117 陽性、CD144 陰性細胞および CD140 陽性の性質を有する細胞を取得するには、ヒト骨髓由来間葉系細胞から CD34 陽性細胞と CD144 陽性細胞を上述した免疫磁気ビーズの方法などを利用して除去した後、CD117 陽性および CD140  
20 陽性の細胞画分を分取することで目的の細胞を分離することができる。

### 13. 膝β細胞特異的遺伝子のプロモーターレポーターベクターを用いた膝β細胞前駆細胞の分離

膝β細胞への分化能を有する細胞から誘導した膝β細胞または膝β細胞の前駆細胞を  
25 効率的に分離するために、発光オワンクラゲの緑色蛍光蛋白質 (green fluorescent protein; GFP) を遺伝子導入のためのレポーター遺伝子の指標として用いることができる。

具体的には、膝β細胞で特異的に発現している遺伝子または前記 9. で取得した膝β細胞への分化能を有する細胞で特異的に発現している遺伝子のプロモーターの下流に GFP 遺伝子をつないだベクターを作製し、膝β細胞への分化能を有する細胞に導入する。

このようなレポーターベクターを導入された細胞を薬剤耐性などの指標で分離後、膵β細胞へと分化誘導する。分化誘導した細胞はGFPを発現し、蛍光を発生する。蛍光を発生した膵β細胞ならびに膵β細胞前駆細胞はフローサイトメーターを用いて容易に分離することができる（フローサイトメーター自由自在、p. 44-52、秀潤社、1999年）。

- 5 膵β細胞で特異的に発現している遺伝子のプロモーターとしてはインスリン、pax などを用いることができる。

ベクターとしては、上述した動物細胞用のプラスミドベクター、アデノウイルスベクターなどを用いることができる。

10 14. Hoechst 33342 を用いた膵β細胞への分化能を有する細胞の分離

- Hoechst 33342 は DNA 結合色素であり、生きたままの細胞を染色することができる。骨髓由来間葉系細胞の大多数は激しく分裂しているため、非常に明るく染色されるが、未熟な細胞ほど暗く染まる。このことは、細胞が未熟なほど、ABC (ATP binding cassette) トランスポーターによる色素排除能力が大きいことを示す文献の記載（中内啓光、蛋白質核酸酵素、Vol. 45, No. 13, 2056-2062, 2000）から支持される。従って、  
15 Hoechst 33342 を用いて供試細胞を染色して、染色されない(Hoechst33342 を取り込まない)細胞を分離することによって、本発明の膵β細胞への分化能を有する細胞を単離することができる。

- 具体的には、例えば、骨髓由来間葉系細胞を Hoechst 33342 で染色した後、FACS を  
20 用いて UV レーザーをあてて短波長と長波長の2重染色解析を行うことによって、骨髓中から Hoechst 33342 で暗く染まる細胞を分離することができる。Hoechst 33342 を取り込まない未熟な細胞は、Side populationとして、分画することができる

[Goodell, MA et al. J. Exp. Med., 183, 1797-1806 (1996),  
[http://www.bcm.tmc.edu/genetherapy/goodell/new\\_site/index2.html](http://www.bcm.tmc.edu/genetherapy/goodell/new_site/index2.html) 参照]。

25

以上詳述したとおり、本発明によれば、膵β細胞の破壊ならびに変性に伴う糖尿病などの耐糖能異常に基づく疾患などの耐糖能異常に基づく疾患の治療ならびに治療薬の探索に有効な間葉系細胞およびこれに由来する膵β細胞が提供される。また本発明によれば、該細胞の膵β細胞への分化に有用なサイトカイン、転写因子、生理活性物質、接着

分子/細胞外基質などの膵β細胞形成剤およびこれらの利用法が提供される。

#### 図面の簡単な説明

- 5 図1Aは、マウス骨髄由来間葉系細胞 (KUSA/A1) から膵β細胞への分化誘導の手順を示した図面である。KUSA/A1 に Pdx-1/IPF-1 をトランスフェクションし、1 μg/ml のピューロマイシンと 10ng/ml の bFGF を添加した無血清 DMEM 培地で培養を行い、その後上清を採取した。
- 10 図1B は、上清を採取する手順と、上清採取に用いた培養液を示した図面である。1週間の培養のあと、全てのディッシュの培養液を捨て、PBS を用いてディッシュ毎細胞を3回繰り返し洗浄し、洗浄後、上清採取に用いる培養液、即ち、25.0mM グルコースを含有する DMEM 培養液、2.5mM グルコースを含有する Kreb's リンゲル液 (KRS)、または 5.5mM あるいは 55.5mM グルコースを含有する Hank's 液を加えて1時間、33℃下に 5%CO<sub>2</sub> 濃度のインキュベーターを用いて培養した後、1ml の培養液を採取しインスリン濃度を測定した。
- 15

- 図2A及びBは、Pdx-1/IPF-1 をトランスフェクションし、10ng/ml の bFGF を添加したインスリン、トランスフェリン、プロゲステロン、ブトレシンおよびセレンウムを含む無血清 DMEM 培地で1週間培養した KUSA/A1 における mouse preproinsulin gene I (197bp) 及び mouse preproinsulin gene II (292bp) の発現を調べた結果を示す図面を示す。該 KUSA/A1 において、mouse preproinsulin gene I (197bp) 及び mouse preproinsulin gene II (292bp) の発現が認められた(レーン2)。10%FBS 添加 DMEM 培地で培養した KUSA/A1 (レーン3)、鋳型 DNA の代わりに滅菌蒸留水を加えた陰性対照 (レーン4)、外側 PCR の生成物の代わりに滅菌蒸留水を加えた陰性対照 (レーン5)
- 20
- 25 においては、mouse preproinsulin gene I および mouse preproinsulin gene II の発現は認めなかった。レーン1はマーカー (100bp ladder) を示す。

図3A及びBは、PCR の結果認められたバンドから PCR 生成物を抽出して塩基配列を決定した結果を示す。決定された塩基配列を NCBI nucleotide -nucleotide BLAST で

検索した結果、それぞれ mouse preproinsulin gene I および mouse preproinsulin gene II の塩基配列の一部と 100%一致していた。

#### 発明を実施するための最良の形態

- 5     以下、本発明をより詳しく説明するため実施例を挙げるが、本発明は之等に限定されない。

#### 実施例 1：マウス骨髄からの膵β細胞への分化能を有する骨髄由来間葉系細胞の取得と培養

- 10     5 週齢の C3H/He マウス 10 匹を、エーテルを用いて麻酔後、頸椎脱臼により致死させた。マウスを半側臥位にして、70%エタノールを十分かけ消毒した。

- 次に、大腿骨周辺の皮膚を広範囲にわたり切開し、大腿骨全面の大腿四頭筋をはさみで切除した。股関節の部分にはさみを入れ、関節をはずし、さらに大腿骨背面の筋肉を切除した。股関節の部分にはさみをいれ、関節をはずし、大腿骨を取り出した。大腿骨  
15     に付着している筋肉をはさみで切除し、大腿骨全体を露出させた。大腿骨の両端をはさみで切断後、テルモ製 23G の針を装着した 2.5ml 注射器に 20%FCS を含有する IMDM 培地を約 1.5ml 入れ、注射針の先端を大腿骨の膝関節側の断端に差し込み、試験管の中に培養液を吹き出すことで、骨髄由来間葉系細胞を押し出した。

- 取得した細胞を、20%FCS、100mg/ml ペニシリン、250ng/ml ストレプトマイシンおよび  
20     85mg/ml アムフォテリシン(amphotericin)を含有する IMDM 培地中、33℃下に 5%CO<sub>2</sub>濃度のインキュベーターを用いて培養した。継代を続けることで、細胞は間葉系細胞へと均一化し、造血系の細胞は消失した。

- 約 4 ヶ月間、上記条件で培養を行い、不死化した細胞を選択した後、希釈により 192  
種類の独立した単一細胞由来の細胞株を取得した。これらの細胞株のうち、膵β細胞への  
25     分化能を有する骨髄由来間葉系細胞の一つを、「KUSA/A1」と命名した。以後、骨髄由来間葉系細胞 KUSA/A1 は、特に指定しない限り、10%FCS、100mg/ml ペニシリンおよび 250ng/ml ストレプトマイシンを含有する DMEM 培地中、33℃下に 5%CO<sub>2</sub>濃度のインキュベーターを用いて培養した。

### 実施例 2 : KUSA/A1 細胞の表面抗原の解析

骨髓中から効率的に脾β細胞形成能を有する細胞を単離、精製するために、KUSA/A1の表面抗原の解析を行った。

- 5 解析に用いたのは、血管内皮細胞の表面抗原として知られている CD105、Flk-1、CD31 および CD144、造血系細胞の表面抗原として知られている CD34、CD117(c-kit)、CD14、CD45、CD90、Ly6A/E(Sca-1)、Ly6c および Ly6g、間葉系細胞の表面抗原として知られている CD140、インテグリン CD49b、CD49d および CD29、マトリックス受容体 CD54、CD102、CD106 および CD44 の 20 種類である。
- 10 まず KUSA/A1 細胞の各  $1 \times 10^4$  個を 96 ウェル U 字プレートにそれぞれ分注した。公知の方法 [酵素抗体法 : 学際企画刊 (1985)] でビオチン標識した抗マウス CD105 抗体 (Pharmingen 社製) を FACS 用緩衝液 (1%BSA-PBS、0.02%EDTA、0.05%NaN<sub>3</sub>、pH7.4) に加え各ウェルに添加し、氷中で 30 分間反応させた。コントロール抗体としては、ラット IgG2a、κ 精製抗体 (Pharmingen 社製) を用いた。緩衝液で 2 回洗浄後、ストレプトア
- 15 ビジン-PE (日本ベクトン・ディッキンソン社製) を 20 μl 加えた。遮光し氷中で 30 分間反応後、緩衝液で 3 回洗浄し、最終的に 500 μl に懸濁して、フローサイトメーターで蛍光強度を測定し、抗体の添加により蛍光強度が増加するか否かで抗体の発現の有無を調べた。その結果、KUSA/A1 細胞は CD105 陰性であることが確認された。
- Flk-1 抗原の発現についても、上記と同様の方法によりビオチン化した抗マウス Flk-1
- 20 抗体 (Pharmingen 社製 ; PM-28181D) を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した。その結果、KUSA/A1 細胞は Flk-1 陰性であることが確認された。
- CD31 抗原の発現については、FITC 標識された抗マウス CD31 抗体 (Pharmingen 社製 ; PM-01954D) を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した。その結果、KUSA/A1 細胞は CD31 陰性であることが確認された。
- 25 CD144 抗原の発現については、ビオチン化した抗マウス CD144 抗体 (Pharmingen 社製 ; PM-28091D) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果、KUSA/A1 細胞は CD144 陰性細胞であることが確認された。
- CD34 抗原の発現については、FITC 標識された抗マウス CD34 抗体 (Pharmingen 社製 ; PM-09434D) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果、

KUSA/A1 細胞は CD34 陰性であることが確認された。

CD117 (c-kit) 抗原の発現については、FITC 標識された抗マウス CD117 抗体 (Pharmingen 社製 ; PM-01904D) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果、KUSA/A1 細胞は CD117 陰性であることが確認された。

- 5     CD14 抗原の発現については、FITC 標識した抗マウス CD14 抗体 (Pharmingen 社製 ; PM-09474) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果、KUSA/A1 細胞は CD14 陽性であることが確認され、BMSC 細胞は CD14 陰性であることが確認された。

- 10    CD45 抗原の発現については、FITC 標識した抗マウス CD45 抗体 (Pharmingen 社製 ; PM-01114) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果、KUSA/A1 細胞は CD45 陰性であることが確認された。

CD90 抗原の発現については、FITC 標識した抗マウス CD90 抗体 (Pharmingen 社製 ; PM-22214) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果、KUSA/A1 細胞は CD90 陰性であることが確認された。

- 15    Ly6A/E (Sca-1) 抗原の発現については、FITC 標識した抗マウス Ly6A/E (Sca-1) 抗体 (Pharmingen 社製 ; PM-01164A) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果、KUSA/A1 細胞は Ly6A/E (Sca-1) 陽性であることが確認された。

- 20    Ly6c 抗原の発現については、FITC 標識した抗マウス Ly6c 抗体 (Pharmingen 社製 ; PM-01152) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果、KUSA/A1 細胞は Ly6c 陽性であることが確認された。

Ly6g 抗原の発現については、FITC 標識した抗マウス Ly6g 抗体 (Pharmingen 社製 ; PM-01214) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果、KUSA/A1 細胞は Ly6g 陰性であることが確認された。

- 25    CD140 抗原の発現については、ビオチン化した抗マウス CD140 抗体 (Pharmingen 社製 ; PM-28011A) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果、KUSA/A1 細胞は CD140 陽性であることが確認された。

CD49b 抗原の発現については、FITC 標識した抗マウス CD49b 抗体 (Pharmingen 社製 ; PM-09794) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果、KUSA/A1 細胞は CD49b 陽性であることが確認された。



CD49d 抗原の発現については、FITC 標識した抗マウス CD49d 抗体 (Pharmingen 社製; PM-01274) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果、KUSA/A1 細胞は CD49d 陰性であることが確認された。

5 実施例 3 : 骨髓由来間葉系細胞から膵β細胞への分化の誘導 (その1)

実施例 1 で得られた KUSA/A1 細胞を、トリプシン処理して、6 ウエルディッシュ (FALCON 社製) に細胞密度がなるべく低密度となるようにしながら移乗させた。

この細胞を、インスリン、トランスフェリン、プロゲステロン、ブトレシンおよびセレンウムを含む無血清 DMEM 培地および 10%FBS を含有する DMEM 培地のそれぞれで、

10 33℃下に 5%CO<sub>2</sub> 濃度のインキュベーターを用いて、12 日間培養した。

無血清培地および血清含有培地を用いた各ウエルのそれぞれ一つずつに、bFGF (Recombinant Human Basic Fibroblast Growth Factor, R&D 社製) を最終濃度が 10ng/ml となるように加えた。以後、特別に指定しない限り、同様の条件で、培地を 2 日ごとに交換しながら細胞培養を行った。

15 12 日間の培養のあと、全てのウエルについて培地を捨て、PBS を用いてウエルごと細胞を 3 度繰り返し洗浄した。洗浄後、全てのウエルに新たに PBS を 2ml 加え、2 時間、33℃下に 5%CO<sub>2</sub> 濃度のインキュベーターを用いて培養した。

2 時間の培養後、PBS を廃棄し、新たに 25.0mM グルコースを含有する DMEM を 2ml 加え、さらに 2 時間、33℃下に 5%CO<sub>2</sub> 濃度のインキュベーターを用いて培養した。

20 グルコース添加後、2 時間で培養を終え、次いで、各ウエルの上清をピペットを用いて約 2ml ずつチューブ (collection tube) に収集した。

これらの各上清サンプルについて、ELISA 法 (インスリン測定キット、MORINAGA 社製) を用いて、インスリン濃度を計測した。

その結果、bFGF およびインスリン、トランスフェリン、プロゲステロン、ブトレシンおよびセレンウムを含む無血清 DMEM 培地で培養した細胞の上清については、223pg/ml のインスリンを検出した。一方、bFGF および 10%FBS を含有する DMEM 培地で培養した細胞の上清については、インスリンは、検出されなかった (測定感度以下、即ち 39pg/mL 以下であった)。

さらに、bFGF を含まず、インスリン、トランスフェリン、プロゲステロン、ブトレ

シンおよびセレンウムを含む無血清 DMEM 培地で培養した細胞の上清については、51.9pg/ml でインスリンが検出された。これに対して、bFGF を含まず 10%FBS を含有する DMEM 培地で培養した細胞の上清については、インスリンは検出されなかった(測定感度以下)。

- 5     コントロールとして、ウエルの洗浄に用いた PBS および洗浄後にウエルに加えるのに用いた 25.0mM グルコースを含有する DMEM についても、同様の方法を用いてインスリン濃度を測定したが、これらのインスリン濃度は、測定感度以下であった。

実施例 4：骨髄由来間葉系細胞から膵β細胞への分化の誘導 (その2)

- 10     ピューロマイシン耐性遺伝子を組み込んだプラスミドベクター pCAGIPuro に、配列表の配列番号 1 に示す Pancreatic duodenal homeobox 1 遺伝子 (Pdx-1/IPF-1) を組み込んだプラスミドベクター pCAGIPuro pdx を、コンピテントな大腸菌に取り込ませて形質転換させ、G1AGEN Plasmid Maxi Kits (Q1AGEN 社製) を用いてプラスミドを調整した。
- 15     実施例 1 で得られた KUSA/A1 に FuGENE transfection reagent (Roche 社製) を用いて、リポフェクション法により転写因子である Pdx-1/IPF-1 をトランスフェクションし、1 μg/ml のピューロマイシンと 10ng/ml の bFGF を添加したインスリン、トランスフェリン、プロゲステロン、プトレシンおよびセレンウムを含む無血清 DMEM 培地で 33℃下に 5%CO<sub>2</sub> 濃度のインキュベーターを用いて 1 週間培養した。培地は 2 日毎に交換しながら細胞培養を行った。KUSA/A1 から膵β細胞への分化誘導プロトコルを図 1 A に示す。
- 20     1 週間の培養のあと、全てのディッシュの培養液を捨て、PBS を用いてディッシュ毎細胞を 3 回繰り返し洗浄し、洗浄後、上清採取に用いる培養液、即ち、25.0mM グルコースを含有する DMEM 培養液、2.5mM グルコースを含有する Kreb's リンゲル液 (KRS)、または 5.5mM あるいは 55.5mM グルコースを含有する Hank's 液を、6 cm および 10cm ディッシュにそれぞれ 2ml および 4ml 加えて 1 時間、33℃下に 5%CO<sub>2</sub> 濃度のインキュベーターを用いて培養した。1 時間の培養の後、1ml の培養液を採取しインスリン濃度を測定した。上清採取手順を図 1 B に示す。
- 25

その結果、インスリン、トランスフェリン、プロゲステロン、プトレシンおよびセレンウムを含む無血清 DMEM 培地に含まれるインスリンは 151-268pg/ml であった。上清採取に用いた DMEM 培養液、Kreb's リンゲル液、Hank's 液は全て測定感度以下

(39pg/ml 以下)であったが、bFGF を添加したインスリン、トランスフェリン、プロゲステロン、ブトレシンおよびセレンウムを含む無血清 DMEM 培地で培養した細胞の上清には、上清採取に用いたいずれの培養液上清中にもインスリンを認め、最高値は 2200pg/ml であった。結果を表 1 に示す。

5

表 1 KUSA/A1 をプロトコールに従って、無血清 DMEM 培地で  
1 週間あるいは 2 週間培養した細胞の培養液上清中の  
インスリン濃度

No.	Medium	Insulin (pg/ml)
Exp. 1	Hank's Solution, 50mM glucose	771
		625
		496
		383
Exp. 2	DMEM, 54.8mM glucose	119
		141
		208
Exp. 3	Hank's Solution, 50mM glucose	2200
		1500
		1190
Exp. 4	KRS, 2.6mM glucose, 10% FBS	798
		764
Exp. 5	DMEM, 54.8mM glucose	1440
		402
Exp. 6	Hank's solution, 5.6mM glucose	389
		349

- 10 Pdx-1/IPF-1 をトランスフェクションし、1  $\mu$ g/ml のピューロマイシンと 10ng/ml の bFGF を添加したインスリン、トランスフェリン、プロゲステロン、ブトレシンおよびセレンウムを含む無血清 DMEM 培地で 33℃下に 5%CO<sub>2</sub>濃度のインキュベーターを用いて 1 週間培養した KUSA/A1 から ISOGEN (日本ジーン) を用いて RNA を取得した。次に、first-strand cDNA synthesis キット (Amersham pharmacia biotec 社) を用いて RNA
- 15 から first strand cDNA を作製した。次に作製した first strand cDNA を基質として rTaq DNA polymerase (TOYOBO)を用いて、mouse preproinsulin gene I および mouse

preproinsulin gene II について nested RT-PCR を行った。mouse preproinsulin gene I および mouse preproinsulin gene II の増幅には表2に示す塩基配列を有する合成 DNA を用いた。RT-PCR の条件および使用したプライマーを表2に示す。

5 表2 RT-PCR の条件および使用したプライマー

<u>PCR の条件</u>	
	denaturation at 94°C for 1min
	annealing at 54 or 67°C for 1min
	elongation at 72°C for 1min
10	number of cycles was 35
<u>使用したプライマー</u>	
	<u>Mouse preproinsulin gene I</u>
	Outer : 351bp (Tm:54°C)
15	Forward: ccagcccttagtgaccagcta
	Reverse: agatgctggtgcagcaciga
	Inner : 197bp (Tm:67°C)
	Forward: ccagctataatcagagac
	Reverse: gtgtagaagaagccacgct
20	<u>Mouse preproinsulin gene II</u>
	Outer : 395bp (Tm:54°C)
	Forward: tccgctacaatcaaaaacca
	Reverse: gctgggtagtggtgggtct
	Inner : 292bp (Tm:67°C)
25	Forward: tcaacatggccctgtggat
	Reverse: cagcactgatctacaatgcc

その結果、Pdx-1/IPF-1 をトランスフェクションし、10ng/ml の bFGF を添加したイン

- スリン、トランスフェリン、プロゲステロン、ブトレシンおよびセレンウムを含む無血清 DMEM 培地で1週間培養した KUSA/A1 に mouse preproinsulin gene I (197bp) および mouse preproinsulin gene II (292bp) の発現を認めた(レーン2)。10%FBS 添加 DMEM 培地で培養した KUSA/A1 (レーン3)、鋳型 DNA の代わりに滅菌蒸留水を加えた陰性対照 (レーン4)、外側 PCR の生成物の代わりに滅菌蒸留水を加えた陰性対照 (レーン5) に mouse preproinsulin gene I および mouse preproinsulin gene II の発現は認めなかった。レーン1はマーカー (100bp ladder) を用いた。結果を図2A及びBに示す。
- PCR の結果認められたバンドから PCR 生成物を抽出して塩基配列を決定した。決定された塩基配列を NCBI nucleotide -nucleotide BLAST で検索した結果、それぞれ mouse preproinsulin gene I および mouse preproinsulin gene II の塩基配列の一部と 100% 一致していた。結果を図3A及び図3Bに示す。

#### 産業上の利用の可能性

- 15 本発明によれば、膵β細胞の破壊ならびに変性に伴う糖尿病などの耐糖能異常に基づく疾患の治療ならびに治療薬の探索に有効な間葉系細胞およびこれに由来する膵β細胞が提供される。また本発明によれば、該細胞の膵β細胞への分化に有用なサイトカイン、転写因子、生理活性物質、接着分子/細胞外基質などの膵β細胞形成剤およびこれらの利用法が提供される。

## 請 求 の 範 囲

1. 哺乳動物由来の間葉系細胞を以下の (a) ~ (e) から選ばれる少なくとも1つの工程に付すことを特徴とする、間葉系細胞から膵β細胞を形成する方法:
  - 5 a) 哺乳動物の検体から得られる膵β細胞に分化し得る間葉系細胞を増殖させる工程、
  - b) 哺乳動物の検体から得られる間葉系細胞または工程 a) で得られる間葉系細胞から、細胞膜抗原に結合性を有する抗体を用いて膵β細胞に分化し得る間葉系細胞を選択して分離する工程、
  - c) 工程 a) または b) で得られる膵β細胞に分化し得る間葉系細胞またはこれを含む細胞
  - 10 を、該細胞が接触可能なように接着分子/細胞外基質をコートした反応容器中で培養する工程、
  - d) 工程 a)、b) または c) で得られる膵β細胞に分化し得る間葉系細胞またはこれを含む細胞を膵β細胞形成剤と接触させて培養する工程、および
  - e) 工程 c) または d) で得られる膵β細胞を、膵β細胞で特異的に発現する遺伝子を選択
  - 15 マーカーとして選択して分離する工程。
2. 間葉系細胞が、骨髓、筋肉、脾臓、肝臓、小腸、大腸、腎臓、皮下組織、子宮内膜、血液、臍帯血又は胎盤から得られる、請求項1に記載の間葉系細胞から膵β細胞を形成する方法。  
20
3. 工程 b) における間葉系細胞の選択が、CD140 陽性抗体を用いて行われる請求項1または2に記載の間葉系細胞から膵β細胞を形成する方法。
4. 工程 e) における膵β細胞に特異的に発現する遺伝子が、インスリンである請求項
- 25 1 から3のいずれかに記載の間葉系細胞から膵β細胞を形成する方法。
5. 工程 d) における膵β細胞形成剤が、サイトカイン、生理活性物質、転写因子および接着分子/細胞外基質からなる群から選ばれる少なくとも1種である請求項1から4のいずれかに記載の間葉系細胞から膵β細胞を形成する方法。

6. サイトカインが、肝細胞成長因子(HGF)、線維芽細胞増殖因子(bFGF)/FGF-2、インスリン、トランスフェリン、ヘパリン結合 EGF、ガストリン、TGF- $\beta$ 、インスリン様成長因子(IGF-1)、パラサイロイド・ホルモン関連蛋白(PTHrP)、成長ホルモン(growth hormone)、プロラクチン、プラセンタル・ラクトジェン(Placental lactogen)、  
5 グルカゴン様ペプチド 1(Glucagon like peptide-1)、Exendin-4 および KGF(karatinocyte growth factor)からなる群から選ばれる少なくともひとつである、請求項 5 に記載の間葉系細胞を腓 $\beta$ 細胞に形成させる方法。
- 10 7. 生理活性物質が、ニコチンアミド、ベータセルリン、アクチビン A、プロゲステロン、プトレシン(Putrecine)およびセレンウム(Selenium)からなる群から選ばれる少なくともひとつである、請求項 5 に記載の間葉系細胞を腓 $\beta$ 細胞に形成させる方法。
- 15 8. 転写因子が、PTF1a/PTF-P48、Isl-1、Pdx-1/IPF-1、Beta2/neuroD、ngn3、PAX-6、PAX-4、Hlxb-9、Nkx2.2、Nkx6.1、HNF1 $\alpha$ 、HNF1 $\beta$ および HNF4 $\alpha$ からなる群から選ばれる少なくともひとつである、請求項 5 に記載の間葉系細胞を腓 $\beta$ 細胞に形成させる方法。
- 20 9. 接着分子/細胞外基質が、ゼラチン、ラミニン、コラーゲン、アガロース、フィブロネクチンおよびオルニチンからなる群から選ばれる少なくともひとつである、請求項 5 に記載の間葉系細胞を腓 $\beta$ 細胞に形成させる方法。
10. サイトカイン、生理活性物質、転写因子および接着分子/細胞外基質からなる群から選ばれる少なくとも 1 種を有効成分として含有する、請求項 1 から 9 のいずれかに記載の方法に用いられる腓 $\beta$ 細胞形成剤。  
25
11. サイトカインが、肝細胞成長因子(HGF)、線維芽細胞増殖因子(bFGF)/FGF-2、インスリン、トランスフェリン、ヘパリン結合 EGF、ガストリン、TGF- $\beta$ 、インスリン様成長因子(IGF-1)、パラサイロイド・ホルモン関連蛋白(PTHrP)、成長ホルモン(growth hormone)、プロラクチン、プラセンタル・ラクトジェン(Placental lactogen)、

グルカゴン様ペプチド1 (Glucagon like peptide-1)、Exendin-4 および KGF からなる群から選ばれる少なくともひとつである、請求項 10 に記載の膵  $\beta$  細胞形成剤。

12. 生理活性物質が、ニコチンアミド、ベータセルリン、アクチビン A、プロゲスト  
5 ロン、プトレシン (Putrescine) およびセレンウム (Selenium) からなる群から選ばれる少なくともひとつである、請求項 10 に記載の膵  $\beta$  細胞形成剤。

13. 転写因子が、PTF1a/PTF-P48、Isl-1、Pdx-1/IPF-1、Beta2/neuroD、ngn3、PAX-  
6、PAX-4、Hlx-9、Nkx2.2、Nkx6.1、HNF1  $\alpha$ 、HNF1  $\beta$  および HNF4  $\alpha$  からなる群から選  
10 ばれる少なくともひとつである、請求項 10 に記載の膵  $\beta$  細胞形成剤。

14. 接着分子/細胞外基質が、ゼラチン、ラミニン、コラーゲン、アガロース、フィ  
ブロンネクチンおよびオルニチンからなる群から選ばれる少なくともひとつである、請求  
15 項 10 に記載の膵  $\beta$  細胞形成剤。

15. 候補物質の存在下に請求項 1 に記載の方法に従って間葉系細胞から膵  $\beta$  細胞を  
形成させ、候補物質の非存在下に形成される膵  $\beta$  細胞と対比して、膵  $\beta$  細胞の形成を促  
進させる作用を奏する候補物質を選択することを特徴とする、間葉系細胞からの  $\beta$  細胞  
20 の形成を促進する候補物質をスクリーニングする方法。

16. 間葉系細胞が、骨髓、筋肉、脾臓、肝臓、小腸、大腸、腎臓、皮下組織、子宮  
内膜、血液、臍帯血又は胎盤から得られる、請求項 15 に記載の間葉系細胞からの膵  $\beta$   
細胞の形成を促進する候補物質をスクリーニングする方法。

25 17. 工程 b) における間葉系細胞の選択が、CD140 陽性抗体を用いて行われる請求項  
15 または 16 に記載の間葉系細胞からの  $\beta$  細胞の形成を促進する候補物質をスクリー  
ニングする方法。

18. 工程 e) における膵  $\beta$  細胞に特異的に発現する遺伝子が、インスリンである請求



項 15 から 17 のいずれかに記載の間葉系細胞からの膵β細胞の形成を促進する候補物質をスクリーニングする方法。

19. 工程 d)における膵β細胞形成剤が、サイトカイン、生理活性物質、転写因子および接着分子/細胞外基質からなる群から選ばれる少なくとも1種である請求項 15 から 18 のいずれかに記載の間葉系細胞からの膵β細胞の形成を促進する候補物質をスクリーニングする方法。

20. サイトカインが、肝細胞成長因子(HGF)、線維芽細胞増殖因子(bFGF)/FGF-2、インスリン、トランスフェリン、ヘパリン結合 EGF、ガストリン、TGF-β、インスリン様成長因子(IGF-1)、パラサイロイド・ホルモン関連蛋白(PTHrP)、成長ホルモン(growth hormone)、プロラクチン、プラセンタル・ラクトジェン(Placental lactogen)、グルカゴン様ペプチド1(Glucagon like peptide-1)、Exendin-4 およびKGF からなる群から選ばれる少なくともひとつである、請求項 19 に記載の間葉系細胞からの膵β細胞の形成を促進する候補物質をスクリーニングする方法。

21. 生理活性物質が、ニコチンアミド、ベータセルリン、アクチビン A、プロゲステロン、プトレシン(Putrecine)およびセレンウム(Selenium)からなる群から選ばれる少なくともひとつである、請求項 19 に記載の間葉系細胞からの膵β細胞の形成を促進する候補物質をスクリーニングする方法。

22. 転写因子が、PTF1a/PTF-P48、Isl-1、Pdx-1/IPF-1、Beta2/neuroD、ngn3、PAX-6、PAX-4、Hlx-9、Nkx2.2、Nkx6.1、HNF1α、HNF1βおよびHNF4αからなる群から選ばれる少なくともひとつである、請求項 19 に記載の間葉系細胞からの膵β細胞の形成を促進する候補物質をスクリーニングする方法。

23. 接着分子/細胞外基質が、ゼラチン、ラミニン、コラーゲン、アガロース、フィブロネクチンおよびオルニチンからなる群から選ばれる少なくともひとつである、請求項 19 に記載の間葉系細胞からの膵β細胞の形成を促進する候補物質をスクリーニング

する方法。

24. 候補物質が培養組成物である請求項 15 から 23 のいずれかに記載の間葉系細胞からの膵β細胞の形成を促進する候補物質のスクリーニング方法。

5

25. 請求項 15 から 24 のいずれかに記載の間葉系細胞からの膵β細胞の形成を促進する候補物質のスクリーニング方法によって得られる、間葉系細胞からの膵β細胞の形成を促進する活性を有する物質。

10 26. 請求項 1 から 9 のいずれかに記載の方法によって得られる膵β細胞の有効量を患者に投与する、耐糖能異常に基づく疾患を有する患者の疾患を治療する方法。

27. 請求項 1 から 9 のいずれかに記載の方法によって得られる膵β細胞を有効成分として含有する、耐糖能異常に基づく疾患の治療剤。

15

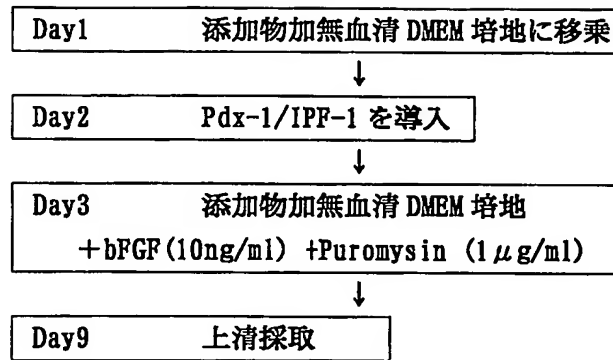
28. 培養皿に単層培養された間葉系細胞上に、インスリン分泌細胞に分化されうる細胞を播き、共培養してインスリン分泌細胞に分化する方法。

29. インスリン分泌細胞に分化されうる細胞が、胚性幹細胞、膵幹細胞、小腸上皮幹細胞、肝臓由来幹細胞及び羊膜細胞からなる群から選ばれる 1 種である、請求項 28 に記載の共培養してインスリン分泌細胞に分化する方法。

20

1/4

## 図 1 A



## B

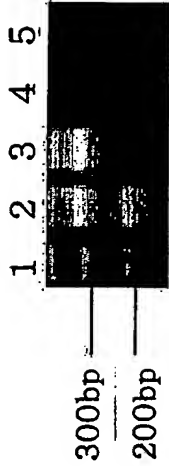
1. PBS で 3 回洗浄
2. 以下の培養液で 1 時間 33℃ 下 5%CO<sub>2</sub> 濃度のインキュベーターを用いて培養
3. 上清を 1ml 採取

## 上清採取用いた培養液

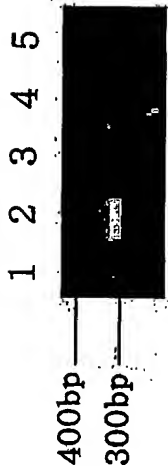
無添加 DMEM 培地 (25.0mM グルコース含有)  
Kreb's リンゲル液 (2.5mM グルコース含有)  
Hank's 液 (5.5mM あるいは 55.5mM グルコース含有)

図2

A



B



3/4

## 図 3 A

**Mouse preproinsulin gene I**

&gt;gi|52712|emb|X04725.1|MMINSIG Mouse preproinsulin gene I

Length = 1384

Score = 240 bits (121), Expect = 4e-61

Identities = 121/121 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 17 cccctgctggccctgcttgcctctgggagcccaaaccacccaggcttttgtcaaacag 76

|||||

Sbjct: 853 cccctgctggccctgcttgcctctgggagcccaaaccacccaggcttttgtcaaacag 912

Query: 77 catcttttgtgtccccaccctggttagaggctctctacctggtgtgtggggagcgtggcttc 136

|||||

Sbjct: 913 catcttttgtgtccccaccctggttagaggctctctacctggtgtgtggggagcgtggcttc 972

Query: 137 t 137

|

Sbjct: 973 t 973

4/4

## 図 3 B

## Mouse preproinsulin gene II

&gt;gi|52714|emb|X04724.1|MMINSIIG Mouse preproinsulin gene II

Length = 2408

Score = 240 bits (121), Expect = 3e-61

Identities = 121/121 (100%)

Strand = Plus / Minus

Query: 1 acttcacggcgggacatgggtgtgtagaagaagccacgctccccacacaccaggtagaga 60

|||||

Sbjct: 1305 acttcacggcgggacatgggtgtgtagaagaagccacgctccccacacaccaggtagaga 1246

Query: 61 gcciccaccaggtgggaaccacaaaggtgctgcttgacaaaagcctgggtgggtgggac 120

|||||

Sbjct: 1245 gcciccaccaggtgggaaccacaaaggtgctgcttgacaaaagcctgggtgggtgggac 1186

Query: 121 t 121

|

Sbjct: 1185 t 1185

1/2  
SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.

&lt;120&gt; Pdx-1/IPF-1

&lt;130&gt; P03-19

&lt;160&gt; 1

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 939

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; M.musculus

&lt;400&gt; 1

accatgaaca gtgaggagca gtactacgcg gccacacagc tctacaagga cccgtgcgca	60
ttccagaggg gcccggtgcc agagttcagc gctaaccccc ctgcgtgcct gtacatgggc	120
cgccagcccc cacctccgcc gccacccag tttaacagct cgctgggac actggagcag	180
ggaagtcctc cggacatctc ccatacga gtgccccgc tcgctccga cgacccggt	240
ggcgctcacc tccaccacca ctttcagct cagctcgggc tcgcccattc acctcccgga	300
ctttccga atggaaccga gcctgggggc ctggaagagc ccaaccggt ccagctccct	360
ttcccgtgga tgaatccac caaagctcac gcgtggaaag gccagtgggc aggagtgct	420
tacacagcg aacccgagga aaacaagagg accgtactg cctacacccg ggcgagctg	480
ctggagctgg agaaggaatt cttatttaac aaatacatct cccggccccg ccgggtggag	540

2/2

ctggcagtga tgttgaactt gaccgagaga cacatcaaaa tctggttcca aaaccgtcgc 600

atgaagtgga aaaaagagga agataagaaa cgtagtagcg ggaccccgag tggggcggt 660

ggggcggaag agccggagca agattgtgcg gtgacctcgg gcgaggagct gctggcagtg 720

ccaccgtgc caccctccgg aggtgccgtg ccccaggcg tcccagctgc agtccgggag 780

ggcctactgc cttcgggcct tagcgtgtcg ccacagccct ccagcatcgc gccactgcga 840

ccgcaggaac cccggtgagg acagcagtct gagggtagc gggctcggga cccagagtgt 900

ggacgtggga gcgggcagct ggataaggga acttaacct 939



## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO3/04812

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12N5/02, C12N5/06, C12N15/09, C12Q1/02, A61K35/39, A61P3/10

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12N5/02, C12N5/06, C12N15/09, C12Q1/02, A61K35/39, A61P3/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/A	SILVER, K. et al., ARIP cells as a model for pancreatic beta cell growth and development, Pancreas, 2001, Vol. 22, No. 2, p. 141-147	10-13, 27/ 1-9, 14-24, 28-29
X/A	RAWDON, B. B. et al., Development of embryonic chick insulin cells in culture: Beneficial effects of serum-free medium, reised nutrient, and biomatrix, In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal, 1997, Vol. 33, No. 10, p. 774-782	10-12, 14, 27/ 1-9, 13, 15-24, 28-29

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日  
03. 07. 03国際調査報告の発送日  
15.07.03国際調査機関の名称及びあて先  
日本国特許庁 (ISA/J P)  
郵便番号 100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号特許庁審査官 (権限のある職員)  
七條 里美

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4B 2936



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/A	HART, A.W. et al., Attenuation of FGF signalling in mouse beta-cells leads to diabetes, Nature, 2000, Vol. 408, No. 6814, p. 864-868	10-11, 13, 27/ 1-9, 12-24, 28 -29
X/A	NIEUWENHUIZEN, A.G. et al., Progesterone stimulates pancreatic cell proliferation in vivo, Eur J Endocrinol, 1999, Vol. 140, No. 3, p. 256-263	10, 12, 27/ 1-9, 11, 13-2 4, 28-29
X/A	FERBER, S. et al., Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia, Nat Med, 2000, Vol. 6, No. 5, p. 568-572	10, 13, 27/ 1-9, 11-12, 14 -24, 28-29
X/A	CRISERA, C.A. et al., Expression and role of laminin-1 in mouse pancreatic organogenesis, Diabetes, 2000, Vol. 49, No. 6, p. 936-944	10, 14, 27/ 1-9, 11-13, 15 -24, 28-29
X/A	KERR-CONTE, J. et al., Ductal cyst formation in collagen-embedded adult human islet preparations. A means to the reproduction of nesidioblastosis in vitro, Diabetes, 1996, Vol. 45, No. 8, p. 1108-1114	10, 14, 27/ 1-9, 11-13, 15 -24, 28-29
A	LUMELSKY, N. et al., Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets, Science, 2001, Vol. 292, No. 5520, p. 1389-1394	1-24, 27-29
A	SORIA, B. et al., Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice, Diabetes, 2000, Vol. 49, No. 2, p. 157-162	1-24, 27-29
A	PITTENGER, M.F. et al., Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells, Science, 1999, Vol. 284, No. 5411, p. 143-147	1-24, 27-29
A	RAMIYA, V.K. et al., Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells, Nat Med, 2000, Vol. 6, No. 3, p. 278-282	1-24, 27-29
A	MBALAVIELE, G. et al., Human mesenchymal stem cells promote human osteoclast differentiation from CD34+ bone marrow hematopoietic progenitors, Endocrinology, 1999, Vol. 140, No. 8, p. 3736-3743	28-29

## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 26 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

前記請求の範囲に記載された発明は、人の身体の治療による処置に係る発明であるから、国際調査を要しないものである。

2. ☒ 請求の範囲 25 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

前記請求の範囲の「膵β細胞の形成を促進する活性を有する物質」について、明細書には、一般的なスクリーニング方法が記載されているのみであり、具体的な「物質」については何ら記載されていない。また、出願時の技術常識を勘案しても具体的にどのようなものが包含されるのか全く不明である。したがって、前記請求の範囲の記載は不明確であり、有意義な国際調査をすることができない。

3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-27は、膵β細胞に分化し得る間葉系細胞を培養し、膵β細胞を形成する方法に係る発明が記載されている。一方、請求の範囲28-29は、間葉系細胞上に、インスリン分泌細胞に分化せしめる細胞を播き、共培養してインスリン分泌細胞に分化する方法に係る発明が記載されている。ここで、両発明に共通する事項は、「膵β細胞 (インスリン分泌細胞) に分化し得る細胞から、膵β細胞 (インスリン分泌細胞) を形成する方法」である。しかし、例えば「Science, 2001, Vol. 292, No. 5520, p. 1389-1394」に記載されるように、既に、膵β細胞 (インスリン分泌細胞) に分化し得る細胞から、膵β細胞 (インスリン分泌細胞) を形成する方法は公知であるから、上記共通する事項は特別な技術的特徴であるとはいえない。そうすると、請求の範囲1-29に記載された発明は、特別な技術的特徴を含む技術的な関係にあるものとはいえず、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。よって、本出願に係る発明の数は2と認める。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。